Über die Kohlehydrate und Eiweißstoffe der rohen Kaffeebohne

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Philosophischen Fakultät
(Sektion II)

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt

im November 1936

von

GERTRUD KOPP
aus FREIBURG i. Brsg.

Über die Kohlehydrate und Eiweißstoffe der rohen Kaffeebohne

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Philosophischen Fakultät
(Sektion II)

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt

im November 1936

von

GERTRUD KOPP
aus FREIBURG i. Brsg.

Berichterstatter: Professor Dr. B. Bleyer

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dez. 1936.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Der Förderin meiner Studien

in Dankbarkeit

Vorliegende Arbeit wurde im Institut für Pharmazie und Nahrungsmittelchemie der Universität München in der Zeit vom Wintersemester 1934/35 bis Sommersemester 1936 ausgeführt.

Die Anregung zu dieser Arbeit gab mir Herr Professor Dr. K. T ä u f e l , dem ich an dieser Stelle für seine freundlichen Ratschläge meinen ergebensten Dank ausspreche.

Nach der Berufung des Herrn Professor Dr.K.Täufel nach Karlsruhe hat Herr Professor Dr. B. B l e y e r in liebenswürdiger Weise die Fortführung der Arbeit durch seine bereitwillige Hilfe ermöglicht und unterstützt, wofür ich ihm zu ganz besonderem Danke verpflichtet bin.

Herrn Dr.phil.habil. H. T h a l e r danke ich für die freundliche Durchsicht der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis.

		Seite
A.	Einleitung	1
B.	Experimenteller Teil.	
I.	Analyse des Kaffees	3
II.	Die Untersuchung der wasserlöslichen Kohlehydrate	7
III.	Die Untersuchung des Kaffee-Eiweißes	17
	1) Qualitative und quantitative Erfassung stickstoffhaltiger Extrakte aus Rohkaffee	21
	2) Gewinnung des wasserlöslichen Eiweißes	23
IV.	Hydrolyse des Kaffee-Eiweißes	25
C.	Zusammenfassung	42

A. Einleitung.

Der Kaffee stellt heute in nahezu allen Ländern ein sehr verbreitetes Genussmittel für den Menschen dar; seine chemische Zusammensetzung ist deshalb seit langer Zeit Gegenstand größten Interesses gewesen. Angesichts dieser Tatsache wäre anzunehmen, dass seine Inhaltsstoffe genauestens bekannt sind. Für einen Teil dieser trifft dies auch zu, für den andern aber bestehen noch mancherlei Unklarheiten.

Am meisten ist begreiflicherweise über das Coffein und den Gehalt der Kaffeesamen an diesem Alkaloid bekannt geworden, da ihm die anregende Wirkung auf das Zentralnervensystem mindestens zu einem beachtlichen Teil zuzuschreiben ist. Es findet sich im Kaffee chemisch gebunden vor und zwar in Form des von P a y e n (1) isolierten Kalium-Coffein-Doppelsalzes der Chlorogensäure. Diese früher als Kaffeegerbsäure bezeichnete Substanz wurde von K. G o r t e r (2) näher erforscht. Seine Untersuchungen ergaben, dass die Chlorogensäure als Gemisch verschiedener Substanzen zu betrachten ist. Nach W. P l ü c k e r und W. K e i l h o l z (3) liegen von der gesamten Säure, die sich davon im Kaffee vorfindet, 84 % als Coffein-Kaliumsalz, 8 % als primäres Kaliumsalz und nur 8 % als freie Chlorogensäure vor. In neuester Zeit wurde diesem Komplex wieder stärkere Beachtung in den Arbeiten von C. T i e d t k e (4) geschenkt. Ihn interessierten die Veränderungen, die diese Substanz beim Erhitzen, wie es der Röstprozess darstellt, erleidet. In Analogie zu dieser Tatsache erhitzt er die Chlorogensäure im Bombenrohr im feuchten Zustand und kam zu dem Ergebnis, dass dabei weitgehende Veränderungen in ihrem Molekül stattfinden (Abspaltung von Kohlendioxyd). Irgendwelche genauen Aussagen aber, welche Veränderungen die Substanz beim Röstprozess selbst erleidet, lassen sich zur Zeit noch keineswegs machen.

Genau bekannt ist der ätherlösliche Teil der Kaffeesamen, das braune flüssige Kaffeefett. Es liegt in einer Menge von 10 - 15 % vor und seine Zusammensetzung wurde von A. H e i d u s c h k a und R. K u h n (5) aufgeklärt.

Ausser den üblichen Säuren ist im Kaffee auch Zitronensäure zu rund 0.5 % gefunden worden (6).

Sehr verschiedene Angaben findet man im Schrifttum über die Art und Menge der im Kaffee vorhandenen wasser-

---

1) Ann.Chim. et Phys. 26, 108 (1849).
2) Ann.Chim. 358, 327; 359, 217 (1908). - Arch.Pharm. 247, 184 (1909).
3) Ztschr.Unters.Lebensm. 66, 200 (1933).
4) Ztschr.Unters.Lebensm. 71, 217 (1936).
5) Journ. prakt.Chem. N.F. 139, 269 (1934).
6) K.Täufel u. K.Schoierer, Ztschr.Unters.Lebensm. 71, 297 (1936).

löslichen Kohlehydrate. Für Saccharose werden Zahlen von 6 - 12 % angegeben. Widersprüche bestehen insbesondere über die Anwesenheit von reduzierenden Zuckern. E. S c h u l z e (1) konnte in einem heiß hergestellten alkoholisch-wäßrigen Auszug Saccharose nachweisen. Nach der Hydrolyse fand er Glukose und Galaktose. L. G r a f (2) fand im methylalkoholischen Auszug weder Glukose noch irgend einen anderen direkt reduzierenden Zucker. Dagegen konnte er Saccharose eindeutig erkennen.

Noch weniger bekannt sind aber die Art und Menge des Eiweißes im Kaffee. Man findet im Schrifttum lediglich Angaben über die " Stickstoffsubstanzen " als Sammelbegriff. Diesen oder ihren beim Röstprozess entstehenden Zersetzungsprodukten scheint aber nach den Arbeiten von B. B l e y e r und Mitarbeitern (3) physiologische Wirkung zuzukommen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Prüfung der wasserlöslichen Kohlehydrate und die Untersuchung des im Kaffee enthaltenen Eiweißes sowie der Nachweis einiger für das Kaffee-Eiweiß charakteristischer Aminosäuren.

Die folgende Tabelle gibt ein Bild über Durchschnittszahlen an wesentlichen Kaffee-Inhaltsstoffen (nach dem Schrifttum vom Jahre 1926):

4)

Tabelle 1.

	Kaffee roh	Kaffee geröstet
	%	%
Menge	100	82.2
Wasser	11.3	2.7
Stickstoffsubstanzen	12.6	13.9
Fette und Wachse	11.7	14.4
Zucker	7.8	2.8
Dextrin	0.8	1.3
Kaffeegerbsäure	8.4	4.7
Rohfaser	23.9	23.9
Asche	3.8	3.9
wässriger Auszug	29.5	28.5
Coffein	1.18	1.24

Die Bezeichnung "Rohfaser" muss heute fallengelassen werden, da sie wenig genau und undefiniert ist. An ihre Stelle tritt der Wert für Zellulose, mit dem sich K. T ä u f e l und H. T h a l e r (5) befassten. Die Chlorogensäure ist nicht gesondert angeführt, sie ist in dem Summarischen Begriff "Kaffeegerbsäure" enthalten.

---

1) Chemiker Ztg. 17, 1263 (1893).
2) Ztschr.angew.Chem.13, 1077 (1901).
3) Biochem.Zs.286, 408 (1936).
4) J.König, Nahrung und Ernährung des Menschen, 1926. S.196.
5) Ztschr. Unters.Lebensm. 69, 152 (1935).

B. Experimenteller Teil.

I. Analyse des Kaffees.

Die erste Aufgabe bei der Untersuchung des vorliegenden Kaffees bestand darin festzustellen, ob er zumindest qualitativ als auch quantitativ die in der vorher aufgeführten Tabelle angegebenen Bestandteile enthielt, also einen normalen Kaffee darstellte, wobei Aussagen über seine Qualität nicht gemacht wurden.

Zur Bearbeitung kam Rohkaffee Santos Mischung Nr.7. Die grünen Bohnen wurden grob gemahlen und 1 Tag lang im Vakuum über Calciumchlorid und 2 Tage über Phosphorpentoxyd getrocknet Nach dieser Zeit wurden sie ein zweites Mal so fein gemahlen, dass das Sieb Nr.3 des D.A.B.IV mit einer Maschenweite von 2 mm das ganze Gut durchließ. In diesem Zustand wurde die zerkleinerte Droge in einer Glasstopfenflasche gut verschlossen aufbewahrt und für alle Untersuchungen verwendet.

Als erstes wurde die qualitative Prüfung des Kaffees auf Mineralbestandteile vorgenommen. Die Droge wurde in einer Platinschale verascht und mit verdünnter Salzsäure aufgenommen. Die Asche zeigte einen deutlich blauen Anflug, es gelang aber nicht, diese Farbe durch die Anwesenheit irgend eines charakteristischen Ions zu erklären. Mit Schwefelwasserstoff wurde in saurer Lösung kein Niederschlag erhalten, in der Schwefelammoniumgruppe war Eisen und Aluminium nur in Spuren nachweisbar.

Tabelle 2.

Qualitative Zusammensetzung der Kaffee-Asche.

Kationen	Anionen
Kalium	Phosphorsäure
Calcium	Kieselsäure
Magnesium	Chlor
Eisen	
Aluminium	

Schwefelsäure, von der J. B e l l [1] Mengen von 3.1 bis 4.5 % angibt, wurde nicht gefunden. Kalium schien in reichlicher Menge vorhanden zu sein, was sich mit den Angaben von J. B e l l deckt, der den Gehalt an Kalium in der Asche mit 51.5 bis 55.8 % angibt.

Bestimmung des Wassergehaltes:

Die Ermittlung des Wassergehaltes war für die Berechnung aller im Verlaufe der Untersuchung sich ergebenden Werte und Resultate von großer Wichtigkeit, da diese auf

1) Die Analyse und Verfälschung der Nahrungsmittel, S.48.

die Trockensubstanz bezogen werden sollten. Er wurde sowohl durch 4-stündiges Trocknen bei 105° wie auch durch Destillation mit Tetrachloräthan, wobei die Apparatur von J. Pritzker und R. Jungkunz (1) zur Verwendung gelangte. Beide Verfahren ergaben übereinstimmend einen Wassergehalt von 7.15 %.

Bestimmung des Ätherauszuges (fettes Oel, Wachs und Harzstoffe):

Die Droge wurde 8 Stunden lang im Soxhlet-Apparat mit Petroläther extrahiert, nach dem Abdestillieren desselben der Rückstand bei 105° konstant getrocknet und das braune flüssige Kaffeeöl gewogen.

gefunden: 16.18 %.

Bestimmung der Asche:

Sie geschah in der üblichen Weise.

gefunden: 3.84 %

Bestimmung der Phosphorsäure:

Sie wurde in der Asche nach dem Verfahren von Lorenz (2) ermittelt.

gefunden: P_2O_5 9.77 % (ber. auf die Asche)

Bestimmung des Coffeins:

Es kam dafür das Verfahren nach K. Lendrich und F.E. Nottbohm, in der Ausführung des Kaiserlichen Gesundheitsamtes, verbessert von J. Großfeld und G. Steinhoff, zur Anwendung. Danach versetzt man 10 g Kaffee im Becherglas mit 5 ccm 10-%iger Ammoniaklösung und lässt unter öfterem Umrühren 2 Stunden lang stehen. Darauf mischt man 20 g Seesand zu und extrahiert 3 Stunden lang im Soxhlet-Apparat mit Tetrachlorkohlenstoff. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird der Rückstand mit 50 ccm Wasser zum Sieden erhitzt und unter Nachspülen mit heißem Wasser in einen Messkolben von 200 ccm übergeführt. Nach dem Erkalten gibt man zwecks Reinigung 5 ccm einer 20-%igen Kupfersulfatlösung und 5 ccm n-Natronlauge zu, füllt mit Wasser bis zur Marke auf und filtriert. 100 ccm dieser Lösung werden je zweimal mit je 50 und 25 ccm Chloroform im Scheidetrichter ausgeschüttelt, die Ausschüttelungen vereinigt und filtriert. Nach Abdestillieren des Chloroforms wird der Rückstand im Trockenschrank bei 85-90° konstant getrocknet und gewogen. Es wurde auf diese Weise der Coffeingehalt des Rohkaffees

zu 1.26 % gefunden.

---

1) Mitt. Lebensm.Unters. Hygiene 20, 65 (1929).
2) A.Bäurle, W.Riedel, K.Täufel, Ztschr.Unters.Lebensm. 67, 274 (1934).

Bestimmung des Stickstoffs:

5 g Rohkaffee wurden in bekannter Weise mit Schwefelsäure aufgeschlossen und nach Zerstörung der organischen Substanz darin der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Nach Abzug des dem Coffein angehörenden Stickstoffs wurde der Gehalt an dem letzteren zu

1.55 % gefunden.

Durch Multiplikation mit dem mittleren Faktor 6.25 erhält man den Wert für vorhandenes Eiweiß:

1.55 x 6.25 = 9.68 %.

Von Wichtigkeit sind jene Bestandteile der Kaffeebohne, die sich in Wasser lösen und die in ihrer Gesamtheit den „wässrigen Extrakt" darstellen. Zum Vergleich wurde sowohl mit heißem, als auch mit kaltem Wasser extrahiert.

Bestimmung des heißen wässrigen Auszuges:

10 g Droge wurden mit 200 ccm Wasser übergossen, unter Umrühren zum Sieden erhitzt und 5 Min. darin erhalten. Flüssigkeit samt Droge wurden in einen Messkolben von 250 ccm Inhalt übergeführt, nach dem Erkalten bis zur Marke aufgefüllt und unter Umschütteln 1 Tag stehen gelassen. Die Flüssigkeit war von gelbgrüner Farbe, trübe und nur schwer filtrierbar. 50 ccm dieser wässrigen Lösung wurden in einer Nickelschale auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft, bei 100-105° konstant getrocknet und gewogen.

gefunden: 30.15 % Extrakt,
darin Asche: 12.0 %

Bestimmung des kalten wässrigen Auszuges:

10 g Rohkaffee wurden in einem Messkolben von 250 ccm Inhalt mit kaltem Wasser bis zur Marke aufgefüllt, häufig umgeschüttelt und 1 Tag stehen gelassen. Nach dem Verdampfen der Lösung und Trocknen des Rückstandes wurde

gefunden: 30.50 % Extrakt,
darin Asche: 11.9 %

In der gleichen Weise wie bei der Droge wurden im kalten wässrigen Auszug der Stickstoff- und Coffeingehalt ermittelt.

gefunden:	Coffein	4.07 %
	Stickstoff	2.39 %
daraus berechnet:	Eiweiß	14.97 %

Dies bedeutet, dass in dem kalten wässrigen Auszug (30.5 % des Rohkaffees) die Hälfte der in dem ursprünglichen Kaffee vorhandenen Eiweißstoffe, deren Gesamtmenge 9.68 % ausmacht, enthalten sind. Diese Tatsache ist wichtig für die in der Folge angestellten Untersuchungen über das Eiweiß des Rohkaffees.

Wie schon eingangs erwähnt, stößt man bei der quantitativen Bestimmung der Chlorogensäure im Kaffee auf Schwierigkeiten.

Nach der Methode von P l ü c k e r und K e i l h o l z wurde folgendermaßen verfahren: 100 g Rohkaffee wurden durch Extraktion mit Petroläther im Soxhlet-Apparat 12 Stunden lang entfettet. Das Material wurde alsdann mit 1 Liter 80-proz. Alkohols 1 Stunde lang am Rückflusskühler erhitzt. Nach Dekantieren des Lösungsmittels wurde diese Behandlungsweise mit frischem Alkohol noch 3-mal wiederholt, wobei beim dritten Mal 2 Stunden und beim vierten Mal 4 Stunden erhitzt wurde. Die etwa 4 Liter betragende Flüssigkeitsmenge engte man auf etwa 1.5 Liter ein und fällte darin die Zitronen- und Phosphorsäure durch Zugabe von gesättigter Bariumacetatlösung aus. Nach dem Abnutschen des Niederschlags wurde das Filtrat auf etwa 300 ccm eingedampft. Bei dieser Konzentration wurde die Flüssigkeit trübe und es schied sich ein weißgelber Niederschlag aus; eine Probe desselben war in heißem Wasser unlöslich. Mit heißem 95-proz. Alkohol gelang es den Niederschlag in Lösung zu bringen, beim Erkalten jedoch trat erneut Trübung ein. Schließlich wurde der gesamte Niederschlag von der ursprünglichen Lösung abfiltriert und sowohl Niederschlag als Lösung wurden auf die Anwesenheit von Chlorogensäure geprüft.

Die Lösung ergab mit:

1) Ammoniak einen olivgrünen Niederschlag,

2) Eisenchloridlösung einen schwarzen Niederschlag, die darüberstehende Flüssigkeit war grün gefärbt.

3) Bleiacetatlösung einen zitronengelben Niederschlag.

Der von der ursprünglichen Lösung abfiltrierte Niederschlag wurde mit Wasser ausgekocht. Die filtrierte gelbgefärbte Lösung ergab mit:

1) Ammoniak eine olivgrüne Färbung,

2) Eisenchloridlösung geringe Mengen eines schwarzen Niederschlages unter Grünfärbung der Lösung.

3) Bleiacetatlösung einen zitronengelben Niederschlag.

Die ganze Arbeitsweise wurden ein zweites Mal durchgeführt, aber auch hier zeigte sich, dass eine homogene Lösung von Chlorogensäure nicht zu erhalten war, dass vielmehr irgendwelche anderen Substanzen, die mit in Lösung gegangen waren, Chlorogensäure occludierten. sodass eine quantitative Erfassung nicht mehr möglich war. Nachdem die Chlorogensäure für die Bearbeitung der in der Einleitung angedeuteten Probleme, nämlich den Nachweis der Saccharose und die Untersuchung der Eiweißstoffe, unwichtig war, wurden die Versuche zur quantitativen Ermittlung

dieser Säure nicht weiter verfolgt. Die bei den im Vorhergehenden beschriebenen Versuchen erhaltenen Werte sind in der Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3.

Zusammensetzung des untersuchten Rohkaffees.

Wasser	7.15 %
Ätherextrakt	16.18 %
Asche	3.84 %
P_2O_5	0.375 %
Coffein	1.26 %
Stickstoff	1.55 %
Eiweiß (N_2 mal 6.25)	9.68 %

Tabelle 4 vermittelt die Übersicht über die Menge und die Zusammensetzung des heißen und kalten wässerigen Auszuges.

Heißer wässeriger	Auszug	: 30.15 %
	Asche	: 12.00 %
Kalter wässeriger	Auszug	: 30.5 %
	Asche	: 11.9 %
	Coffein	: 4.07 %
	Stickstoff	: 2-39 %
	Eiweiß	: 14.97 %

Der schon genannten Arbeit von K. T ä u f e l und H. T h a l e r (1), die sich mit den am Aufbau der Zellwand beteiligten wasserunlöslichen Kohlehydraten beschäftigt, ist die folgende Tabelle 5 entnommen.

Tabelle 5.

Zellwand (Rückstand n. d. Auszug mit Äther und Wasser)	52.6 %
Furfurolwert der Zellwand (bezogen auf Trockensubstanz)	1.6 %
Mannan	15.3 %
Xylan	1.8 %
Cellulose	29.9 %

II. Die Untersuchung der wasserlöslichen Kohlehydrate.

Für die folgenden Zuckerbestimmungen kam die jodometrische Cuprotitration zur Anwendung. Dabei ist folgendes zu beachten: Die Reduktion des Cupriion zu Cuproion folgt nicht einer einfachen stöchiometrischen Gleichung, vielmehr hängt die gebildete Menge Kupferoxydul von einer Reihe von Faktoren ab. Dabei spielt sowohl die Alkalität der Lösung, wie die Art und Dauer der Er-

1) Ztschr. Unters. Lebensmittel 69, 152 (1935).

wärmung eine wichtige Rolle. Unter Umständen können auch evtl. vorhandene Begleitstoffe das Resultat beeinflussen. So bildet z.B. eine Ketose, obwohl sie stärkere Reduktionseigenschaften besitzt als eine Aldose, aus Fehling'scher Lösung weniger Kupferoxydul als die letztere. Verringert man aber die Alkalität der Kupferlösung, so wird nunmehr von der Ketose mehr Cuprooxyd gebildet. Die quantitative Auswertung dieser Reaktion ist daher eine rein empirische, weshalb die angegebenen Versuchsbedingungen genauestens beachtet und eingehalten werden müssen, um übereinstimmende Ergebnisse zu erhalten.

Es war zunächst notwendig, die im Rohkaffee enthaltenen löslichen Kohlehydrate von den Begleitstoffen nach Möglichkeit zu trennen, was durch Extrahieren mit 85-proz. Alkohol geschah: 50 g des mit Petroläther entfetteten Kaffees wurden mit 500 ccm 85-proz. Alkohol 1/2 Stunde lang im Rückflusskühler im Sieden gehalten. Nach dieser Zeit wurde die Flüssigkeit von der Droge heiß abfiltriert und diese Behandlungsweise noch zweimal während 15 Min. wiederholt. Die filtrierten Auszüge wurden vereinigt, der Alkohol abdestilliert und die wässerige Flüssigkeit auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft. Der Rückstand stellte eine zähe, gelbbraune, klebrige Masse dar. Er wurde mit Wasser aufgenommen und hierauf die Chlorogensäure durch Zugabe von Bleiessig als Bleichlorogenat quantitativ ausgefällt. Das überschüssige Blei wurde alsdann mit gesättigter Natriumsulfatlösung wieder entfernt. Ohne Rücksicht auf den Niederschlag wurde die Flüssigkeit im Messkolben auf 250 ccm aufgefüllt und filtriert. Die Prüfung des Filtrates auf Zucker mit Fehling'schem Reagens ergab sowohl vor als nach der Inversion positiven Befund. In dieser Lösung wurde nun der Gehalt an reduzierendem Zucker vor und nach der Inversion ermittelt.

Quantitative Bestimmung der Zucker. [1]

a) vor der Inversion.

Es werden benötigt:
eine alkalische Kupfersulfatlösung, die 69.27 g Kupfersulfat, zum Liter gelöst, enthält = Lösung A und
eine alkalische Seignettesalzlösung (346.0 g Seignettesalz, 100 g Ätzkali auf 1000 ccm Wasser) = Lösung B.

Es musste zuerst der Blindwert dieser Lösung ermittelt werden: 10 ccm der Lösung A wurden mit 10 ccm der Lösung B und so viel Wasser versetzt, dass das Gesamtvolumen 50 ccm betrug. Das Flüssigkeitsgemisch wurde zum Sieden erhitzt und genau 2 Minuten darin erhalten. Nach

---

1) N.Schoorl, Zs.f.angew.Chem. 12, 633 (1899). - Zs.f.analyt.Chem. 56, 191 (1917).

dem schnellen Abkühlen auf 25° wurden 3 g Kaliumjodid, in 10 ccm Wasser gelöst,und 10 ccm 25-proz. Schwefelsäure zugesetzt und das überschüssige Jod unter Verwendung von Stärke als Indikator mit n/10-Natriumthiosulfatlösung zurücktitriert. Es wurden im Mittel verbraucht: 27.33 ccm. Im Hauptversuch wurde in der gleichen Weise verfahren unter Zugabe von 8 ccm der zu untersuchenden Zuckerlösung.

Verbraucht für den Hauptversuch: 20.96 ccm n/10 Natriumthiosulfatlösung.

Nach Abzug von dem Blindwert ergibt sich der wirkliche Verbrauch zu 6.37 ccm. Diese Zahl entspricht nach der Zuckerreduktionstabelle von S c h o o r l , bezogen auf 250 ccm ursprüngliche Lösung 636.88 mg reduz. Zucker = 1.16 % (ber. auf Glukose).

b) nach der Inversion.

J.M. K o l t h o f f [1] empfiehlt für die Inversion (Hydrolyse) einer Zuckerlösung die Vorschrift von F e l l e n b e r g (2). Die nach seiner Vorschrift invertierte Zuckerlösung lieferte aber sehr fehlerhafte Ergebnisse, weshalb ihr die in der Zoll-Vorschrift gegebene Arbeitsweise vorgezogen wurde.

100 ccm der zuckerhaltigen Lösung wurden mit 10 ccm Salzsäure vom spez.Gewicht 1.19 während genau 5 Min. auf einer Temperatur von 67-70° gehalten. Nach dieser Zeit wurde rasch auf 15° abgekühlt, mit Kalilauge gegen Phenolphtalein genau neutralisiert und mit Wasser auf 250 ccm aufgefüllt. Die Bestimmung wurde in der gleichen Weise, wie unter a) beschrieben, mit 5 ccm dieser Lösung durchgeführt.

Verbraucht n/10 $Na_2S_2O_3$ = 10.52 ccm = 34.68 mg reduz. Zucker in 5 ccm = 4.335 g in 250 ccm ursprünglicher Lösung = 7.93 % (ber. auf Glukose).

Reduzierender Zucker nach der Inversion [3]	7.93 %
Direkt reduzierender Zucker (3)	1.16 %
Durch die Inversion entstandener reduzierender Zucker	6.77 %

mal Faktor 0.95 = 6.43 % Saccharose.

Bei der erhaltenen Zahl von 1.16 % direkt reduz. Zucker lassen sich nun keinerlei Aussagen machen über die Art desselben, ob Aldose oder Ketose. Zur Kontrolle wurden weitere Bestimmungen durchgeführt und zwar Titration in sodaalkalischer Lösung nach dem Verfahren von J. B o u g a u l t (4) in der Abänderung von J.M. K o l t h o f f . Wiederholt ausgeführte Bestimmungen jedoch er-

---

1) Die Praxis der Maßanalyse, 2.Teil, S.419.
2) Mitt.a.d.Geb.d.Lebensmittelunters.u.Hygiene, 11, 148 (1920).
3) berechnet als Glukose.
4) Journ. de Pharm. et de Chim. 16, 97, 313 (1917).

gaben Werte, die wesentlich von denjenigen, die durch die Cuprotitration erhalten wurden, abwichen. Es ist möglich, dass Fruktose vorhanden ist und dass sie den Ablauf der Reaktion in unbekannter Weise stört oder aber auch, dass andere reduzierende Substanzen, z.B. Eiweiß, Jod verbrauchen. Es lassen sich darüber keine Aussagen machen.

Die Menge von über 6 g Saccharose in 100 g Rohkaffee ließ die Möglichkeit der Isolierung derselben als aussichtsreich erscheinen.

Das Schrifttum empfiehlt hierzu mannigfache Wege. Für vielerlei Drogen sind diese Methoden mit Erfolg angewendet worden, für die Isolierung der Saccharose aus Rohkaffee aber kommen sie nicht in Frage, wie aus den folgenden Versuchen hervorgeht.

1) Das einfachste Verfahren zur Gewinnung von Saccharose besteht in der direkten Kristallisation derselben. Hierzu wurden 100 g entfetteter Rohkaffee, wie vorher beschrieben, mit 85-proz. Alkohol extrahiert. Dieser Extrakt wurde im Vakuum bei 42-44° stark eingeengt und die verbleibende gelb gefärbte Lösung im evakuierten Exsikkator über Schwefelsäure 1 Tag lang ruhig stehen gelassen. Der Rückstand war dunkelgelb, zäh, klebrig und schloss in sich Kristalle ein. Fehling'sche Lösung zeigte in einer Probe schwach positive Reaktion vor, stark positive nach der Inversion an. Diese klebrige Masse wurde nun mit heißem 95-proz. Alkohol verrieben und dieser zur Kristallisation zur Seite gestellt. Der erhaltene Rückstand war jedoch wieder nur eine braune klebrige Masse. Dasselbe war nach der Verreibung mit heißem Methylalkohol der Fall. Sämtliche Versuche, die Saccharose aus der braunen Masse, in der sie sicher enthalten war, herauszulösen und zur Kristallisation zu bringen, waren erfolglos.

2) Es wurde deshalb ein anderes Verfahren versucht, das von E. Schulze und S. Frankfurt (1) in die präparative Praxis eingeführt wurde. Es wird hierbei die Saccharose auf dem Wege über das Strontiumsaccharat, ähnlich wie bei der technischen Melasseaufarbeitung, isoliert. Aus je 100 g entfettetem Rohkaffee wurden in bekannter Weise Auszüge mit 85-proz. Alkohol und mit Wasser in der Siedehitze hergestellt. Um die Inversion während des Kochens zu verhindern, wurde ein Zusatz von Calciumcarbonat gemacht. Die Auszüge wurden filtriert, bis an die Siedetemperatur gebracht und mit 300 ccm einer heiß gesättigten Strontiumhydroxydlösung 1/2 Stunde lang gekocht. [Verwendet wurde Strontiumhydroxyd „Schering", das leider auch beachtliche Mengen von Carbonat enthielt, ein reineres Präparat war jedoch nicht zu erhalten.] Die Niederschläge wurden von den Lösungen abfiltriert und zwischen Filtrierpapier stark abgepresst. Hierauf wurden sie in einer Porzellanschale mit etwas Wasser verrieben,

---

1) Zs.f.physiol.Chem. 20, 511 (1895).

mit 200 ccm kochender Strontiumhydroxydlösung übergossen, 1/2 Stunde lang gekocht und durch einen Warmwassertrichter filtriert, worauf mit heißer Strontiumlösung gewaschen wurde. Die Niederschläge wurden wieder zwischen Filtrierpapier stark abgepresst, mit Wasser angerieben und dann in diese Suspension Kohlendioxyd bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion eingeleitet, was 2 Tage in Anspruch nahm. Die vom Strontiumcarbonat abfiltrierte Flüssigkeit wurde alsdann auf dem Wasserbad bis auf etwa 20 ccm eingedampft. Weder beim Eindunsten des alkoholischen noch des wässrigen Auszuges verblieben zuckerähnliche Substanzen. Die Flüssigkeiten waren in diesem stark eingeengten Zustande weder sirupös noch klebrig, sondern hinterließen nach dem Verdampfen zur Trockne lediglich einen grauweißen Rückstand, der keinerlei positive Reaktion auf Zucker gab. Das Scheitern dieses zweiten Versuchs, die Saccharose aus dem Rohkaffee zu isolieren, gab den Anlass, nunmehr einen gänzlich neuen Weg zu beschreiten, um zum Ziel zu gelangen.

3) Isolierung der Saccharose auf dem Wege über das Octacetylderivat (1).

Die Tatsache, dass eine in einem Molekül vorhandene OH-Gruppe mit dem Acetylrest $-COCH_3$- charakteristische Verbindungen eingehen kann, ist von größter Bedeutung gewesen. Insbesondere wurden der Zuckerchemie neue Wege für Synthesen gezeigt.

In der Folgezeit wurden von K. F r e u d e n b e r g und M. H a r d e r (2) ein quantitatives Verfahren ausgearbeitet für die Bestimmung dieser in einem Molekül vorhandenen Acetylgruppen, so wie sie für die Bestimmung der Methoxylgruppe schon existierte. Die Acetylzahl ist in vielen Fällen ein gutes Hilfsmittel, wenn es sich darum handelt eine Substanz zu identifizieren. Die verschiedenen Zuckerarten sind der Acetylierung sehr zugänglich, so dass alle in einem Molekül vorhandenen Hydroxylgruppen in Reaktion treten. Die Acetylprodukte zeichnen sich dadurch aus, dass sie in kaltem Wasser unlöslich und auch gegenüber siedendem Wasser sehr beständig sind; leicht löslich dagegen sind sie in organischen Lösungsmitteln wie Äther oder Chloroform. Diese Eigenschaften geben die Möglichkeit die Saccharose über das Acetylderivat von begleitenden Stoffen abzutrennen. Das in der Folge beschriebene Verfahren wurde in zwei Fällen mit gutem Erfolg angewendet.

a) Rohkaffee.

250 g entfetteter Rohkaffee wurden mit 2 Litern 80-proz. Alkohol 1 Stunde lang am Rückflusskühler gekocht, die Lösung heiß filtriert und die Filtrationsrück-

---

1) K.Täufel, H.Thaler u.G.Kopp, Ztschr.Unters.Lebensm. 71, 390 (1936).

2) Liebigs Ann. 433, 230 (1923).

stände noch zweimal je 1/2 Stunde mit 1 Liter 80-proz. Alkohol in der gleichen Weise behandelt. Aus den vereinigten Auszügen destillierte man den Alkohol ab und dampfte die verbleibende wässerige Flüssigkeit noch etwas weiter ein. Als sie begann zähe zu werden, wurde die sirupöse Masse mit wenig Wasser aufgenommen, das Eiweiß und die Chlorogensäure mit wenig Bleiessig vollständig ausgefällt und das überschüssige Blei mit gesättigter Natriumsulfatlösung wieder entfernt. Nach dem Abfiltrieren der Lösung vom Niederschlag engte man die etwa 1 Liter betragende Flüssigkeitsmenge im Vakuum bei 40-45° bis zur Sirupkonsistenz ein. - Für das Gelingen der Acetylierung ist ein möglichst wasserfreies Präparat eine wichtige Vorbedingung. Das Trocknen dieser sirupösen Masse bereitete jedoch zunächst einige Schwierigkeiten. Zweitägiges Stehen im Vakuum über Schwefelsäure hatte keinen großen Erfolg. Trockener jedoch wurde die Substanz nach 5-tägigem Stehen über Phosphorpentoxyd. Eine kleine Menge wurde versuchsweise mit feinem Seesand verrieben und erneut getrocknet. Der Erfolg war aber gering und die Zugabe des Seesandes wirkte in diesem Ansatz später bei der Acetylierung störend, da sich ein fester Bodensatz im Kolben bildete, der eine gleichmäßige Durchmischung der Reaktionsflüssigkeit verhinderte. Da ein vollkommen trockenes Präparat nicht erhalten werden konnte, wurde die braune Masse, die zwar nicht mehr klebrig, aber doch zähe war, für die Acetylierung verwendet. Ausbeute: 50 g.

Acetylierung des Produkts.

20 g desselben wurden mit 60 g frisch entwässertem, feinst gepulvertem Natriumacetat innig verrieben, in einen Kolben von 500 ccm Fassungsraum übergeführt und mit 150 ccm frisch destilliertem Essigsäureanhydrid versetzt. Nach Zugabe von einigen Siedesteinen wurde das Reaktionsgemisch während 6 Stunden am Rückflusskühler im Sieden erhalten. In den Kolben wurde eine Rührvorrichtung eingebaut, sodass für mechanische Durchmischung während der ganzen Zeit gesorgt war. Noch heiß wurde das Reaktionsgemisch in 500 ccm heißen Wassers unter dauerndem Umrühren eingegossen (Abzug, heißes Essigsäureanhydrid). Nachdem sich der unlösliche Teil zu Boden gesetzt hatte, wurde die überstehende schwarze Flüssigkeit abgegossen und der Rückstand durch häufiges Verrühren mit 500 ccm heißen Wassers (7- bis 8-mal) bis zum Verschwinden des Geruchs nach Essigsäure gewaschen. Beim Abkühlen erstarrte der Bodensatz zu einer schwarzen Masse. Sie wurde oberflächlich getrocknet und in Äther gelöst. Die ätherische Lösung war braun gefärbt und nach dem Filtrieren vollkommen klar. In einer Kristallisierschale ließ man den Äther bei Zimmertemperatur verdampfen. Der Rückstand hielt hartnäckig Reste von Äther fest, die durch dreimaliges Aufgießen von siedendem Wasser entfernt wurden. Der nunmehr vom Äther befreite Rückstand wurde im Vakuum über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 4.5 g einer braunen lackartigen Masse.

Ob es sich bei dem vorliegenden Produkt nun auch wirklich um das Octacetylderivat der Saccharose handelte, wurde durch die Bestimmung der Acetylzahl nach F r e u d e n b e r g festgestellt.

Für die Bestimmung der in einem Molekül vorhandenen Acetylgruppen wurden ein große Anzahl von Verfahren ausgearbeitet (1). Grundsätzlich beruhen alle Verfahren auf der Abspaltung des Acetylrestes durch Verseifung. Im einfachsten Falle kann dies schon durch Erhitzen mit Wasser im zugeschmolzenen Rohre erreicht werden. Für die Verseifung kommen ferner in Frage Kaliumacetat, Kalk, Magnesia, Säuren (Schwefelsäure, Phosphorsäure usw.). Die Messung des abgespaltenen Acetylrestes kann nun auch auf verschiedene Weise geschehen. Nach der Methode von A. V e r l e y und F. B ö l s i n g wird die gebundene Essigsäure indirekt erfasst, indem nach erschöpfender Acetylierung der Überschuss an Essigsäureanhydrid titrimetrisch zurückgemessen wird. Von allen Verfahren liefert dasjenige von K. F r e u d e n b e r g bei Kohlehydraten die besten Ergebnisse, weshalb es hier zur Anwendung kam. F r e u d e n b e r g betont, dass im besonderen bei der Bestimmung von Acetylresten in Zuckerstoffen die Versuchsbedinungen genauerstens eingehalten werden müssen. Das Prinzip des Freudenberg'schen Verfahrens ist folgendes: Das Acetylprodukt wird in alkoholischer Lösung mit p-Toluolsulfonsäure zum Äthylacetat umgeestert, das flüchtig ist. Nach Abdestillieren desselben wird mit Alkali verseift und der Überschuss an diesem titrimetrisch zurückgemessen. Das Umestern wird dreimal vorgenommen. Abbildung 1 stellt die dazu benutzte Apparatur dar.

Arbeitsweise: Der Kolben a mit einem Fassungsraum von 150 ccm wurde mit 0.3 g Octacetylsaccharose, 5 g p-Toluolsulfonsäure, 30 ccm abs. Alkohol und einigen Siedesteinchen beschickt. Der Kolben b, von etwa 300 ccm Inhalt, enthielt 10 ccm abs. Alkohol. Der Kolben a wurde nunmehr 10 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt unter Inbetriebsetzung des Kühlers c. Nach dieser Zeit erfolgte das Entleeren des Kühlers, Abdestillieren des Kolbeninhalts und Zugabe von 20 ccm des im Tropftrichter befindlichen abs. Alkohols. Es wird in der gleichen Weise wie vorher erhitzt und das Ganze noch einmal wiederholt. Man verfährt also folgendermaßen:

1) Kolben a 10 Min. zum Sieden erhitzen.
2) 15 Min. bei entleertem Kühler c abdestillieren, darnach Zugabe von 20 ccm abs. Alkohol.
3) 10 Min., wie unter 1) angegeben, erhitzen.
4) 10 Min., wie unter 2), abdestillieren.
5) Während 15 Min. 20 ccm Alkohol zutropfen lassen und gleichzeitig bei entleertem Kühler c abdestillieren.
6) 10 Min. bei entleertem Kühler c weiter destillieren.

---

1) Vergl. H.Meyer, Analyse und Konstitutionsermittlung organischer Verbindungen. 5.Auflage, 1933, S.399 ff.

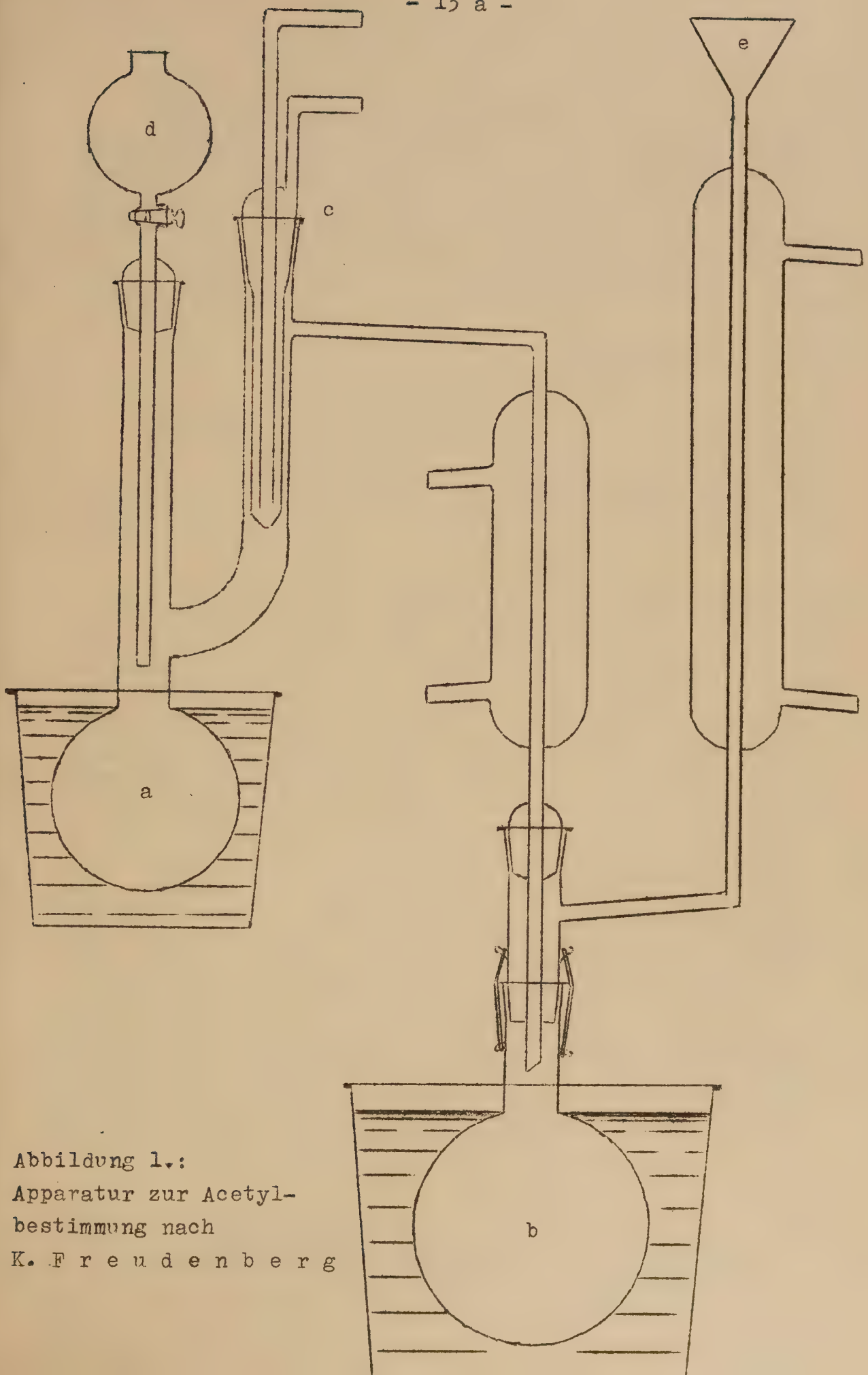

Abbildung 1.:
Apparatur zur Acetyl-
bestimmung nach
K. F r e u d e n b e r g

Nach Beendigung der Destillation wird der Kolben b mit 30 ccm n/5-Natronlauge beschickt und während 10 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Die Temperatur des Kolbens a wird während dieser Zeit auf etwa 80° gehalten. Nach dem Erkalten wird der Inhalt des Kolbens b mit 30 ccm Wasser verdünnt und der Laugenüberschuss mit n/5-Schwefelsäure zurücktitriert (Phenolphtalein als Indikator). Vor dem Hauptversuch wurde zur Einstellung der Lauge ein Blindversuch in genau der gleichen Weise durchgeführt.

0.3066 g Octacetylsaccharose verbrauchten im Mittel

17.8 ccm n/5-Kalilauge

Octacetylsaccharose enthält:
theoretisch 50.74 % gefunden 49.96 % CH_3CO

Von einer weitergehenden Reinigung des Präparats wurde abgesehen, da der gefundene Acetylgehalt schon eine gute Reinheit erkennen ließ und ausserdem die Kristallisation nach P i c t e r und H. V o g e l (1) auf Schwierigkeiten stößt.

Ein sehr gutes Verfahren zur Freilegung von Zuckern aus den Acetylderivaten verdankt man den Untersuchungen von G. Z e m p l é n (2). Hierzu wurden 4 g der Octacetylsaccharose in 10 ccm Chloroform (über Calciumchlorid getrocknet) gelöst und in einer Eis-Kochsalz-Kältemischung auf -20° abgekühlt. In gleicher Weise wurde 1 g Natrium in 50 ccm Methylalkohol gelöst, auf dieselbe Temperatur gebracht und zu der Chloroformlösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde von Zeit zu Zeit gut durchgeschüttelt, wobei man dafür Sorge tragen muss, dass die Temperatur der Kältemischung keinesfalls -16° übersteigt. Nach etwa 10 Min. erstarrte das Reaktionsgemisch zu einer braunen Gallerte, die noch 5 Min. im Kältebad belassen wurde. Unter Umschütteln wurden alsdann 20 ccm Eiswasser zugesetzt, worauf die Additionsverbindung unter Abspaltung von Essigester in Lösung ging. Nach Überführen in einen Scheidetrichter wurde mit Essigsäure sorgfältig neutralisiert und die wässerige Lösung von der Chloroformschicht abgetrennt. Die wässrig-alkoholische Lösung wurde i.V. bei 40° bis zur Sirupkonsistenz eingeengt. Der Sirup wurde mit einem Gemisch aus 5 Teilen 95-proz. Alkohol und 1 Teil Äther verrieben, wobei ein weißer Niederschlag ausfiel, der abfiltriert wurde. Dieser wurde in siedendem 80-proz. Alkohol gelöst und zur Kristallisation beiseite gestellt. Die ausgeschiedenen kleinen Kristalle wurden über P_2O_5 im Vakuum getrocknet.

Smp. 171°; $[\alpha]_D = 66.43°$

---

1) Ber.d.D.Chem.Ges. 62, 1418 (1929).
2) Ber.d.D.Chem.Ges. 59, 1258 (1926).

Die Probe mit Fehling'scher Lösung ergab vor der Inversion negativen, nach der Inversion positiven Befund. Bei der vorliegenden Substanz handelt es sich also ohne Zweifel um Saccharose.

Die Brauchbarkeit dieser Methode für die Isolierung der Saccharose aus pflanzlichem Material wurde zur weiteren Prüfung auf ihre Brauchbarkeit auf Grünmalz angewendet, in welchem ebenfalls Rohrzucker enthalten ist (1).

b) Grünmalz [2].

1 kg Grünmalz wurde fein gemahlen und in 2 Ansätzen zu je 500 g mit 5 Litern 80-proz. Alkohol 6 Stunden lang am Rückflusskühler zum Sieden erhitzt, der erhaltene Extrakt heiß abfiltriert und, da er sauer reagierte, mit verd. Natronlauge neutralisiert. Das Eiweiß wurde in üblicher Weise mit Bleiacetatlösung ausgefällt und das überschüssige Blei mit Natriumsulfatlösung entfernt. Nach der Filtration war die Lösung gelb gefärbt und etwas trüb. Mehrmalige Filtration war ohne Erfolg, sodass die Lösung in diesem Zustande verwendet wurde. Sie wurde qualitativ geprüft:

1) mit Fehling'scher Lösung. Die Reaktion war sowohl vor als auch nach der Inversion stark positiv.

2) nach S. R o t h e n f u ß e r (3) auf die Anwesenheit von Saccharose:

5 ccm der zu untersuchenden Lösung wurden mit einem Gemisch aus 6 g Bariumhydroxyd, in heißem Wasser gelöst, und 25 ccm einer 3-proz. Wasserstoffsuperoxydlösung 20 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach der Filtration wurden 5 ccm des Filtrats mit 5 ccm Diphenylaminreagens erhitzt.

Diphenylaminreagens nach Rothenfußer:

Alkohol. Diphenylaminlösung, 10-proz.	10 ccm
Eisessig	25 ccm
Salzsäure (spez.Gew. 1.19)	65 ccm

Nach 8 Min. trat Blaufärbung ein, welche die Anwesenheit von Saccharose anzeigte.

Um ein Bild über die mengenmäßige Verteilung der anwesenden reduzierenden und nicht reduzierenden Zuckerarten zu gewinnen, wurde wieder der Zuckergehalt vor und nach der Inversion bestimmt. Es wurde dieses Mal nach der Vorschrift von Meisel-Allihn verfahren: 5 ccm der auf 100 ccm verdünnten Lösung (= 0.2 ccm der ursprünglichen Lösung) wurden mit 25 ccm Kupfersulfatlösung, 25 ccm alkalischer Seignettesalzlösung und 40 ccm Wasser zum Sieden erhitzt und genau 2 Min. darin erhalten. Das Kupferoxydul wurde durch einen Goochtiegel filtriert, mit

---

1) H. Lüers, Ztschr.ges.Brauwesen 38, 97 (1915).
2) Das verarbeitete Grünmalz wurde in liebenswürdiger Weise von der Löwenbrauerei zur Verfügung gestellt.
3) Ztschr.Unters.Lebensm. 19, 261 (1910); 24, 93 (1912).

heißem Wasser mehrcremale und schließlich je zweimal mit Alkohol und Äther nachgewaschen. Nach dem Glühen wurde der Rückstand als Kupferoxyd gewogen.

Vor der Inversion gefunden: 8.35 % Zucker.

Die Inversion erfolgte in bekannter Weise.

Nach der Inversion gefunden: 31.87 % Zucker.

Also: 31.87 % Zucker nach der Inversion
8.35 % " vor " "
23.52 x 0.95 = 22.34 % Saccharose

Eine Menge von 8.35 % direkt reduz. Zucker ließ es als unbedingt notwendig erscheinen diesen zu entfernen, resp. zu zerstören, da er der späteren Isolierung der Saccharose hinderlich sein konnte. Zu diesem Zweck wurde die gesamte zuckerhaltige Lösung mit einer heißen Lösung von 600 g Bariumhydroxyd in 800 ccm Wasser und 2 Liter 3-proz.Wasserstoffsuperoxyd 1/2 Stunde lang auf dem Wasserbad erhitzt und dabei gut durchgerührt. Nach der Filtration wurde das Bariumhydroxyd in der etwa 3.5 Liter darstellenden klaren, nahezu farblosen Flüssigkeit durch Einleiten von Kohlendioxyd entfernt. Die abermals filtrierte Lösung ergab mit Fehling'schem Reagens negativen Befund. Sie erwies sich also frei von unmittelbar reduzierenden Zuckerarten. Dagegen fiel, wie erwartet, die Probe nach S. R o t h e n f u ß e r auf Saccharose positiv aus. Die Lösung wurde alsdann i.V. bei 40-42° stark eingeengt. Bei einem Volumen von 50 ccm wurde sie sirupös. Nach dem Erhalten stellte dieser Sirup eine braune zähe Masse dar, die zunächst 2 Tage lang über P_2O_5 i.V. getrocknet wurde. Die Masse war immer noch zäh und klebrig. Sie wurde dann 2 Tage lang bei 55-60° im Trockenschrank gehalten; dadurch gelang es, ihr wenigstens die Klebrigkeit zu nehmen, ein absolut trockenes pulverisierbares Präparat konnte jedoch nicht erhalten werden. Gewicht: rund 30 g. Es wurde nun versucht, durch Auskochen des Präparats mit 95-proz. Alkohol die Saccharose in Lösung und sodann zur Kristallisation zu bringen. Nach dem Verdunsten des Alkohols aber blieb keinerlei Rückstand. Es wurde deshalb wieder die Acetylierung vorgenommen.

Acetylierung.

Das erhaltene Präparat (30 g) wurde mit 90 g frisch entwässertem Natriumacetat und 225 ccm frisch destilliertem Essigsäureanhydrid 7 Stunden lang am Rückflusskühler zum Sieden erhitzt. Auch in diesem Falle wurde das Reaktionsgemisch kräftig durchgerührt. Nach beendeter Acetylierung wurde es in 1 Liter heißes Wasser eingegossen. In der schwarzen Flüssigkeit setzte sich ein dunkel gefärbter Bodensatz ab, der in der beim Rohkaffee beschriebenen Weise gereinigt wurde.

Ausbeute an Acetylderivat: ca. 4 g.

Es stellte ein gelbbraunes, stark bitterschmeckendes Pulver dar.

Die Bestimmung der Acetylzahl erfolgte in der schon beschriebenen Weise nach K. F r e u d e n b e r g .

0.1044 g Acetylderivat verbrauchten 12.20 n/10 Lauge.

Octacetylsaccharose enthält: theoret. 50.74 gef. 50.27 % CH_3CO

Verseifung nach G. Z e m p l é n :

Sie wurde - wie bei Rohkaffee beschrieben - mit 3 g Acetylderivat vorgenommen. Nach dem Verreiben des schließlich erhaltenen Zuckersirups mit Alkohol und Äther schied sich nach dem Stehen über Nacht ein weißer Kristallbrei ab. Er wurde aus Alkohol unter Entfärben der Lösung mit Tierkohle umkristallisiert Daraus wurden die für Saccharose charakteristischen monoklinen Kristalle erhalten, die jedoch noch etwas gelb gefärbt waren. Die Prüfung mit Fehling'schem Reagens ergab vor der Inversion negativen, nach der Inversion positiven Befund. Beim erneuten Umkristallisieren wurde ein weißes Kristallpulver erhalten: Smp. 160-170°.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Verfahren der Isolierung von Saccharose aus pflanzlichem Material über das Acetylderivat sowohl im Rohkaffee als auch im Grünmalz ein befriedigendes Resultat ergab. Die Anwesenheit von Saccharose ist für beide Fälle einwandfrei erwiesen.

III. Die Untersuchung des Kaffee-Eiweißes.

Die Erforschung der chemischen Konstitution der Proteine ist seit Jahrzehnten Gegenstand größten Interesses gewesen. Bahnbrechend waren auf diesem Gebiete die Arbeiten Emil F i s c h e r s und seiner Schüler, denen es gelang, durch Hydrolyse die Proteine in ihre Bestandteile zu zerlegen und sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen über die Wesensart der dabei erhaltenen Abbauprodukte zu machen. Anderseits konnten durch systematische Wiedervereinigung (Synthese) dieser Spaltstücke Substanzen erhalten werden, die sogen. Polypeptide, deren Struktur bekannt war. Es besteht wohl heute kein Zweifel mehr, dass die am Aufbau des Proteinmoleküls beteiligten Aminosäuren in Peptidbindung -CO-NH- ..... vorliegen. Der Weg von den Polypeptiden zu den Proteinen aber ist heute noch keineswegs klar vorgezeichnet. Mit Sicherheit ist anzunehmen, dass am Aufbau eines Eiweißmoleküls eine große Anzahl von Aminosäuren beteiligt sein müssen, ungefähre Molekulargewichtsbestimmungen ergaben Zahlen von 16-200 000. Die Proteine sind also sicher hochmolekulare Körper.

Zur Erforschung der chemischen Konstitution der Proteine wurden grundsätzlich zwei Wege gegangen:

Man versuchte einerseits das Eiweißmolekül durch geeigneten Abbau in Bruchstücke zu zerlegen und aus deren Art und Beschaffenheit Rückschlüsse auf das Ausgangsmate-

rial zu ziehen. Andererseits wurden Verfahren ausgearbeitet, die darauf beruhen, charakteristische Atomgruppen im Eiweißmolekül zu erfassen und ihr Verhalten zu studieren. Vorbildliche Untersuchungen liegen in diesem Sinne von Emil F i s c h e r und E. A b d e r h a l d e n (1) vor. Von großer Bedeutung war auch die von S ö r e n s e n (2) entdeckte Formoltitration, die die Bestimmung der Aminogruppe gestattete. Es ließe sich noch eine Reihe von indirekten Methoden aufzählen, die Beiträge zur Klärung dieses schwierigen Problems lieferten. Seiner Lösung aber näherte man sich beträchtlich, als man daran ging, mit für die Praxis brauchbaren Verfahren Eiweißkörper abzubauen und die erhaltenen Bausteine einer eingehenden Prüfung zu unterziehen Für die Spaltung eines Proteins wurden verschiedene Wege ausgearbeitet; im wesentlichen aber ist es die Hydrolyse, die sich behauptet und die am meisten zur Erforschung des Problems beigetragen hat. Die Hydrolyse eines Proteins kann bewirkt werden durch Säure, Alkali oder durch Enzyme. Nachdem die Aufspaltung des Eiweißmoleküls in verschiedene Bausteine gelungen war, konnte man darangehen, diese zu trennen und zu bestimmen, was aber in der Praxis zunächst auf große Schwierigkeiten stieß. Im Laufe der Jahre aber konnten doch einige sehr gute Methoden geschaffen werden und sie seien der Übersicht halber kurz gestreift. Der Name Emil F i s c h e r und die von ihm geschaffene Estermethode stehen wieder an erster Stelle. Sein Verfahren beruht auf der Überführung der nach der Hydrolyse erhaltenen Aminosäuren in ihre Ester, fraktionierte Destillation derselben, Verseifung der abgetrennten Fraktionen und schließlich fraktionierte Kristallisation. Diese Estermethode hat heute einige Abänderungen erfahren (3), das Grundsätzliche an ihr jedoch ist beibehalten worden. Bei dem Trennungsverfahren von D a k i n (4) wird das wässrige Aminosäurengemisch i.V. mit Butylalkohol extrahiert, wobei Prolin, Oxyprolin und sämtliche Monoaminomonocarbonsäuren in Lösung gehen; beim Erkalten scheiden sich diese Säuren sowie Oxyprolin aus, während Prolin in Lösung bleibt. Die Hexonbasen sowie die Dicarbonsäuren befinden sich in der wässerigen Lösung. Genannt sei ferner das Verfahren nach J o n e s - F o r e m a n (5), das eine Kombination mit der Estermethode darstellt. M.A. B r a z i e r (6) verdankt man ein Verfahren, das auf der verschiedenen Löslichkeit der Kupfersalze der Aminosäuren in Wasser und Methylalkohol beruht. Für die Bestimmung einzelner Aminosäuren haben in neuester Zeit kolorimetrische Verfahren Eingang gefunden, worauf in der Folge

---

1) Ber.d.D.Chem.Ges. 40, 3544 (1907).
2) Biochem.Zs. 7, 59 (1907).
3) E.Fischer, Zs.physiol.Chem. 33, 151 (1901).
4) H.D.Dakin, Journ.biol.Chem. 44, 499 (1920).
5) Biochem.Journ. 8, 463 (1914); 13, 378 (1919). - C. 1916, I, 1097.
6) Biochem.Journ. 24, 1188 (1930).

im einzelnen noch hingewiesen wird. Etwa 20 Aminosäuren lernte man auf diese Weise kennen und weiß, dass sie sicher als Bausteine der Proteine anzusehen sind. Da die Trennung eines durch Hydrolyse erhaltenen Aminosäuregemisches in seine Einzelfraktionen eine zumindest nicht ganz einfache Operation darstellt, begnügt man sich in vielen Fällen mit der Festsetzung der Verteilung der Stickstoffgruppen. Die erste diesbezügliche Methode, die eine Verteilung des Stickstoffs in drei Gruppen vornimmt (Amid-, Mono- und Diaminostickstoff) wurde von W. Haus-mann (1) ausgearbeitet und später von D.D. van Slyke (2) erweitert und vervollkommnet. Sie ermöglicht die Differenzierung des Stickstoffs im Proteinmolekül in 7 Gruppen. Die Hexonbasen werden durch Fällung mit Phosphorwolframsäure von den Monoaminosäuren getrennt. Die letzteren scheidet van Slyke in zwei Gruppen, in eine, welche mit salpetriger Säure reagierenden Amino-Stickstoff besitzt, und in eine zweite, bei der das nicht der Fall ist (Prolin und Oxyprolin). Ausser dieser Methode, die sich in der Praxis bewährt hat, sei hier noch die alkalimetrische Bestimmungsmethode nach R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz (3) genannt. Bei diesem Verfahren ist die Tatsache, dass in alkoholischer Lösung die Hydroxylionenkonzentration der Aminogruppen vollständig zurückgedrängt wird und die Erfassung der Carboxylgruppe durch Titration möglich geworden ist, quantitativ ausgewertet. In neuester Zeit wird von K. Linderström-Lang (4) ein Verfahren sehr empfohlen, nach dem die Aminogruppe mit n/10-alkoholischer Salzsäure in wasserhaltigem Aceton unter Verwendung von Naphtylrot als Indikator direkt titrierbar ist. Bei der schon erwähnten Formoltitration wird die basische Funktion der Aminogruppe durch Formaldehyd ausgeschaltet

$$\begin{matrix} CH_2.NH_2 \\ | \\ COOH \end{matrix} + CH_2O \longrightarrow \begin{matrix} H_2C\text{-}N{=}CH_2 \\ | \\ COOH \end{matrix}$$

sodass auch hier die Carboxylgruppe direkt mit Lauge titriert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Analyse des Eiweißes nach dem Verfahren von van Slyke gearbeitet, eine genaue Beschreibung der einzelnen Versuche wird dort erfolgen. Die Bestimmung des Stickstoffs in 7 Gruppen wurde durch die Sonderbestimmungen einzelner Aminosäuren ergänzt.

---

1) Zs.f.physiol.Chem. 27, 95 (1899); 29, 136 (1900).
2) Ber.d.D.Chem.Ges. 43, 3170 (1910). -
Journ.Biol.Chem. 9, 185 (1911); 16, 187 (1913); 22, 281 (1915); 23, 407 (1915).
3) Ber.d.D.Chem.Ges. 54, 2988 (1921)
4) Zs.physiol.Chem. 173, 32 (1927).

Mit der fortschreitenden Kenntnis der großen Bedeutung der Eiweißstoffe für den pflanzlichen und tierischen Stoffwechsel isolierte man viele verschiedene Proteine. Man stellte dabei fest, dass hinsichtlich des Vorkommens sowie ihrer physikalischen Eigenschaften (Löslichkeit, Ausfällbarkeit usw.) beträchtliche Unterschiede bestanden. Man hat so in der Unzahl der Eiweißkörper eine Einteilung vorgenommen und kennt Albumine, Globuline und Prolamine usw. Einer solchen Einteilung haftet selbstverständlich etwas Willkürliches an, weil keine scharfe Trennungslinie zwischen den einzelnen Eiweißarten gezogen werden kann und Übergänge häufig beobachtet werden. Es ist jedoch richtig, grundsätzlich zwischen einfachen Eiweißkörpern oder Proteinen und zusammengesetzten oder Proteiden zu unterscheiden.

Für die Isolierung von Eiweißkörpern aus pflanzlichen Materialien weist das Schrifttum eine Reihe von Vorschriften auf. Eingehend beschäftigten sich damit V. G r i e s m a y r (1) und Th. O s b o r n e (2). Ausgezeichnete Anweisungen für die Praxis kann man den Arbeiten E. A b d e r h a l d e n s (3) entnehmen.

Die einfachsten in der Natur vorkommenden Eiweißkörper sind die Protamine. Sie zeichnen sich durch hohen Gehalt an Diaminosäuren aus und haben dementsprechend stark basischen Charakter. Sie sind hauptsächlich in den Spermatozoen der Fische enthalten und können daraus durch Extraktion mit verdünnten Säuren und nachherige Fällung mit Alkohol gewonnen werden.

Die „Histone" sind weniger stark basisch als die Protamine. Sie kommen in den Kernen der Thymusdrüse und in den Kernen der Vogelerythrozyten vor. An ihrem Aufbau sind sowohl Monoamino- als auch Diaminosäuren beteiligt. Für ihre Gewinnung kommt im wesentlichen Thymusgewebe in Frage, das in etwa der gleichen Weise wie die Spermatozoen der Fische behandelt wird.

In der Pflanzen- und Tierwelt weit verbreitet sind die Albumine, die in allen lebensfähigen Zellen enthalten sind. Charakteristisch ist für sie die Löslichkeit in reinem Wasser und ihre Fällbarkeit mit Neutralsalzen (Ammonsulfat). Sie enthalten kein Glykokoll.

In der Natur häufig vergesellschaftet sind die Albumine mit den Globulinen, die leicht löslich in neutralen Salzlösungen, z.B. Natriumchloridlösung, sind. Durch Verdünnen mit Wasser oder Dialyse können sie aus ihrer Lösung gefällt werden.

Von all den genannten Proteinen unterscheiden sich die Prolamine durch ihre Löslichkeit in 50- bis 80-proz.

---

1) Die Proteine der Getreidearten, Hülsenfrüchte und Oelsamen sowie einiger Steinfrüchte, 1897.
2) The vegetable proteins, London 1924.
3) Handbuch d.biolog.Arbeitsmethoden, Abt.I, Teil 8, S.588.

Alkohol. Sie sind nur in pflanzlichem Material gefunden worden und stellen den Hauptbestandteil der Eiweißstoffe der Getreidemehle dar. Aus ihrer alkoholischen Lösung können sie mit Wasser ausgefällt werden. Diesen erwähnten Gruppen von Eiweißkörpern sind noch die Gerüsteiweißstoffe oder Skleroproteine zuzufügen. Sie stellen insgesamt die Proteine dar. Ihnen gegenüber stehen die Proteide oder zusammengesetzten Eiweißkörper. Sie enthalten stets, an den typischen Eiweißkörper fest gebunden, eine nicht eiweißartige Komponente, die auch prosthetische Gruppe genannt wird. Man unterscheidet Chromo-, Nukleo-, Gluko- und Phosphorproteide.

1) Qualitative und quantitative Erfassung stickstoffhaltiger Extrakte aus Rohkaffee.

Die Grundlage für die in dieser Richtung mit Kaffee angestellten Versuche bildeten die Ausführungen von G. J l j i i n (1) über die Eiweißstoffe im Tabaksamen.

100 g entfetteter Rohkaffee wurden in 1 Liter Wasser suspendiert und während 1 Stunde bei 40° kräftig durchgerührt. Nach dem Abpressen wurde diese Operation noch einmal wiederholt. Darnach wurde dasselbe Drogenmaterial 2-mal mit je 1 Liter 70-proz. Alkohol, 3-proz. Natriumchloridlösung und o.5-proz. Natronlauge in der gleichen Weise behandelt.

a) Wässeriger Auszug:

Die Lösung war stark trübe, nahezu milchig und die Filtration ausserordentlich schwierig. Es wurde versucht diesen Auszug durch Zentrifugieren zu klären, was jedoch ohne Erfolg war. Schließlich wurde diese trübe Lösung zur Trockne verdampft und darin der Stickstoff- und Coffeingehalt ermittelt.

	Trockenrückstand:	38 g
darin:	Coffein	4.0 %
	Stickstoff.....	2.5 %
	Eiweiß	15.25 %

b) Alkoholischer Auszug:

Er stellte eine schwach gelbgefärbte Flüssigkeit dar, aus der der Alkohol abdestilliert und die verbleibende wässerige Lösung zur Trockne verdampft wurde.

	Trockenrückstand:	1.09 g
darin:	Coffein	1.47 %
	Stickstoff	1.71 %
	Eiweiß	10.69 %

---

1) Biochem.Zs. 273, 350 (1934).

c) Auszug mit 5-proz. Kochsalzlösung:

Der Rückstand war grauweiß gefärbt und betrug

92.07 g

darin: Coffein .... 0.05 %
Stickstoff . 0.09 %
Eiweiß ..... 0.57 %

d) Auszug mit 0.5-proz. Natronlauge:

Der Rückstand war hellgelb gefärbt und betrug

20.01 g

darin: Coffein .... 0.2 %
Stickstoff . 0.04 %
Eiweiß ..... 0.28 %

Tabelle 6.

Übersicht über die Verteilung des Stickstoffs in den einzelnen Lösungsmitteln.

Lösungsmittel	Rückstand %	Gehalt des Rückstandes an Coffein %	Stickstoff %	Eiweiß %
Wasser	38.0	4.0	2.50	16.25
Alkohol, 70-%ig	1.09	1.47	1.71	10.69
Natriumchloridlösung 5-%ig	92.07	0.05	0.09	0.57
Natronlauge, 0.5-%ig	20.01	0.22	0.04	0.28

In der folgenden Tabelle 7 sind die Mengen Eiweiß, welche dem Rohkaffee durch die einzelnen Lösungsmittel entzogen wurden, zusammengestellt.

Tabelle 7.

Gesamteiweiß im Rohkaffee 9.68 %

Lösungsmittel	gelöstes Eiweiß, bezogen auf Rohkaffee %
Wasser	6.17
Alkohol, 70-%ig	0.11
Kochsalzlösung, 5-%ig	0.52
Natronlauge, 0.5-%ig	0.05
insgesamt:	6.85

Die Tabelle zeigt, dass etwa 2/3 des vorhandenen Eiweißes sich mit Wasser herauslösen lassen. Es kann sich im wesentlichen nur um ein Albumin handeln, Globuline und Prolamine scheinen nur in unbedeutenden Mengen vorhanden zu sein. Eine nähere Untersuchung der salz-, alkohol- und alkalilöslichen Anteile wurde aus diesem Grund nicht vorgenommen.

2) Gewinnung des wasserlöslichen Eiweißes.

300 g entfetteter Rohkaffee wurden mit 3 Liter Wasser bei 40° 1 Stunde lang kräftig durchgerührt. Um die Flüssigkeit vor der Entwicklung von Mikroorganismen zu schützen, wurde Toluol zugesetzt, das von Zeit zu Zeit erneuert wurde. Die Flüssigkeit wurde dann durch Abpressen von der Droge getrennt und das Material ein zweites Mal mit 1.5 Liter Wasser in der gleichen Weise ausgezogen. Die vereinigten, etwa 4 Liter Flüssigkeit darstellenden Auszüge waren gelbgrün gefärbt und stark trübe. Eine Filtration durch Papier war ohne jeden Erfolg, auch durch Zentrifugieren wurde eine nur ganz unbedeutende Klärung erreicht. Für die Gewinnung eines reinen Präparates aber ist es unbedingt notwendig, aus der Lösung alle Begleitstoffe nach Möglichkeit zu entfernen. Die Filtration dieses trüben Auszuges bereitete große Schwierigkeiten und gelang schließlich unter Verwendung eines feinen Papierbreis mit einem Zusatz von Kieselgur. Dieser wurde auf einer großen Nutsche an der Wasserstrahlpumpe fest angesaugt. Da die Filtration der großen Flüssigkeitsmenge auf diese Weise viele Tage dauerte, wurde stets reichlich Toluol zugesetzt und das schon klare Filtrat bis zur Verwendung im Eisschrank aufbewahrt. Es war gelb gefärbt und wurde beim Stehen grün, weil die Chlorogensäure auch mit in Lösung gegangen war (Viridinsäure).

Die Fällung eines Proteins aus seiner Lösung kann auf verschiedene Weise erreicht werden, im vorliegenden Fall geschah das Ausfällen durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat. Die Ammoniumsulfatkonzentration, bei der ein Protein ausgefällt wird, ist in weiten Grenzen abhängig von der Behandlung, der dieses vorher unterworfen wurde. Um die Sättigungskonzentration an Ammoniumsulfat für die vorliegende Eiweißlösung kennen zu lernen, wurden Vorversuche mit 10 ccm Untersuchungslösung angestellt. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8.

Sättigungskonzentration an Ammonsulfat in %	Untersuchungslösung
1/10	klar
2/10	schwache Trübung
3/10	milchige Trübung
4/10	schwacher Bodensatz
5/10	schwacher Bodensatz
6/10	starker Bodensatz
7/10	Maximum der Ausfällung
8/10	Beginn der Aufhellung
9/10	schwache Trübung
10/10	Opaleszenz

Daraus ergibt sich, dass das Maximum der Ausfällung bei einer Ammoniumsulfatsättigung zwischen 6/10 und 7/10 liegt.

Die etwa 4 Liter darstellende Flüssigkeit wurde nun mit 2 kg Ammoniumsulfat allmählich unter starkem Umrühren versetzt. Es schied sich ein gelbgrüner Niederschlag aus; nach dem Absetzen desselben wurde die überstehende Flüssigkeit dekantiert und der Niederschlag mehreremale durch Verrühren mit einer etwa 15-proz. Ammonsulfatlösung gewaschen. Darnach wurde mit einer 5-proz. Ammonsulfatlösung und noch einmal mit Eiswasser behandelt, die überstehende Flüssigkeit wieder dekantiert und der Niederschlag auf der Nutsche vorsichtig abgesaugt. Der Rückstand bestand aus einer gelbgrünen, etwas schmierigen Masse, die - mit abs. Alkohol übergossen - über Nacht stehen gelassen wurde. Nach Entfernung des Alkohols wurde das Präparat i.V. getrocknet. Es stellte dann ein grünes Pulver dar. Ausbeute: rund 10 g. Das Präparat gab die Biuret- und die Xanthoproteinreaktion.

Prüfung des Präparats auf Reinheit.

Trotz des sorgfältigen Auswaschens ergab sich jedoch, dass das Präparat noch beachtliche Mengen Ammoniumsulfat enthielt. Sein Coffeingehalt wurde zu 2.49 % bestimmt. Soll aber der hydrolytische Abbau eines Proteins mit Erfolg durchgeführt werden, so ist größtmögliche Reinheit des Ausgangsmaterials eine unerlässliche Vorbedingung. Für die weitere Reinigung des Präparats kam nur die Dialyse in Frage und zwar auf elektrischem Wege. Es wurde dazu der Apparat nach W. P a u l i (1) benützt. Die Elektrodialyse bietet den großen Vorteil gegenüber der gewöhnlichen, dass das Kolloid in ungleich viel kürzerer Zeit von der Elektrolyten aller Art befreit wird. Das Protein wurde während 22 Stunden unter Anlegung von 0.2 Amp. gegen fließendes Wasser dialysiert. Als Membranen wurde bestes Pergamentpapier verwendet. Nach beendeter Dialyse wurde das Protein oberflächlich zwischen Filtrierpapier von Wasser befreit und sodann i.V. über Phosphorpentoxyd getrocknet. Es stellte nun ein gelbliches Pulver mit einem Gewicht von rund 3 g dar. Das Präparat wurde auf seine Reinheit geprüft:

1) Es enthielt keine nachweisbaren Mengen von Sulfat oder Ammoniak. Ausser kleineren Mengen von Carbonat konnten auch andere Anionen nicht mehr nachgewiesen werden.

2) Die Chlorogensäure schien weitgehend entfernt zu sein.

3) Die Identitätsreaktionen auf Coffein waren negativ, was sich mit der Abwesenheit der Chlorogensäure deckt, da das Coffein ja zusammen mit Kalium als Doppelsalz dieser Säure vorliegt.

4) Bei der Prüfung auf Kohlehydrate mit alkoholischer α-Naphtollösung nach M o l i s h trat nur eine

---

1) Biochem.Zs. 152, 355 (1924).

ausserordentlich schwache Violettefärbung auf. Die Probe nach M o l i s h ist aber derartig empfindlich, dass schon Spuren von Filtrierpapier im Präparat eine positive Reaktion geben können. Das Präparat war also auch praktisch frei von Kohlehydraten.

5) Die Asche enthielt keine bestimmbaren Mengen Phosphorsäure.

Das wasserlösliche Eiweiß enthielt:

Wasser	6.27 %
Asche	2.05 %
Gesamt-Stickstoff	11.43 %

berechnet auf Trockensubstanz.

IV. Hydrolyse des Kaffee-Eiweißes nach der Methode von van S l y k e .

Wie schon eingangserwähnt, kann die Hydrolyse von Eiweiß sowohl durch Säure als auch durch Alkali bewerkstelligt werden. Von den Säuren kommen Salzsäure und Schwefelsäure in Frage. In der van S l y k e 'schen Versuchsanordnung wird Salzsäure verwendet und die Spaltung durch mehrstündiges Kochen am Rückflusskühler mit derselben bewirkt, wobei meist eine Erhitzungsdauer von 20-30 Stunden nötig ist, um einen konstanten Wert für den Aminostickstoff zu erhalten. Da dieses Verfahren umständlich und vor allem sehr zeitraubend ist, wurde die Hydrolyse des Kaffee-Eiweißes folgendermaßen bewerkstelligt: 2 g Eiweiß wurden in einem starkwandigen Glas (1) von 100 ccm Inhalt mit 40 ccm 20-proz. Salzsäure versetzt. Das Glas wurde mit dem passenden Deckel verschlossen, dieser durch eine Feder festgeklemmt und ausserdem mit Schnüren verbunden. Das Reaktionsgemisch wurde alsdann während 8 Stunden bei 1.8 atü und 115-118° im Autoclaven (Siccotopf) erhitzt. Nach dem Erkalten wurde der schwarz-braune, aus Huminsubstanzen bestehende Niederschlag abfiltriert, ausgewaschen und die verbleibende hydrolysierte Lösung, die stark nach Schwefelwasserstoff roch, i.V. bei 40° und 12 mm Druck auf etwa 10 ccm eingeengt.

In dem abfiltrierten, aus Huminsubstanzen bestehenden Niederschlag wurde der Stickstoff nach K j e l d a h l bestimmt und zu 0.00448 g gefunden.

Die eingeengte Flüssigkeit, die keine Biuretreaktion mehr gab, wurde mit Wasser in einen Messkolben von 100 ccm übergeführt und bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung war vollkommen klar und rotbraun gefärbt. Das Volumen von 100 ccm diente in der Folge als Grundlage für alle Berechnungen.

---

1) Es wurde ein sogen. Weckglas verwendet.

In 10 ccm dieser Lösung wurde der Gesamt-Stickstoff bestimmt. Es wurde gefunden:

0.20888 g in 100 ccm Lösung
+ 0.00448 g N der Huminsubstanzen
0.21336 g in 100 ccm Hydrolysenlösung = 11.35 %
(Einwaage = 2.0048 g)

In dieser Lösung wurde weiterhin der Aminostickstoff bestimmt. Die dazu verwendete Apparatur ist in Abbildung 2 dargestellt.

Das Prinzip dieser Bestimmung ist folgendes: Primäre aliphatische Aminogruppen reagieren mit salpetriger Säure in charakteristischer Weise unter Freiwerden von Stickstoff:

$$R - NH_2 + HNO_2 \longrightarrow ROH + N_2 + H_2O$$

Der Stickstoff tritt bei dieser Reaktion gasförmig auf, es ist deshalb das Eintreten eines Gleichgewichtszustandes unmöglich, die Reaktion verläuft quantitativ von links nach rechts Das den Stickstoff begleitende Stickoxyd wird durch alkalische Kaliumpermanganatlösung entfernt und die erstere in einer Glasbürette gemessen. Vor dem eigentlichen Versuch wird die Luft aus der gesamten Apparatur durch Entwicklung von Stickoxyd aus Eisessig und Natriumnitrit verdrängt.

Es werden folgende Reagentien benötigt:

1) eine 30-proz. Lösung von reinstem Natriumnitrit in Wasser. Es wurde für die Versuche ein Natriumnitrit von Schering-Kahlbaum verwendet; selbst die als „reinst" bezeichneten Präparate entwickeln mit Essigsäure eine kleine Menge Gas, welches von Kaliumpermanganat nicht absorbiert wird. Es muss deshalb vor dem Hauptversuch der Blindwert der Reagentien ermittelt werden, wobei in 5 Min. nicht mehr als 0.5 ccm Gas entwickelt werden dürfen. Andernfalls ist das Natriumnitrit nicht verwendbar.

2) Eisessig,

3) eine alkalische Kaliumpermanganatlösung, die im Liter 50 g Kaliumpermanganat und 25 g Kaliumhydroxyd gelöst enthält. Sie dient zur Absorption der Stickoxyde.

Die Apparatur besteht aus:

1) dem Desamidierungsgefäß D, das mit dem Einfülltrichter A in Verbindung steht und einen Fassungsraum von etwa 40 ccm besitzt. In ihm erfolgt die Einwirkung der salpetrigen Säure auf die Lösung des Aminokörpers. Das Gefäß A dient dazu, die bei der Entwicklung von Stickoxyd aus D verdrängte Flüssigkeit aufzunehmen.

2) der Bürette B mit Skalenteilung und 10 ccm Inhalt. Sie steht einerseits mit dem Desamidierungsgefäß D durch einen Hahn mit Winkelbohrung und andererseits mit dem Kreuzstück k in Verbindung, das zum Ablassen der Reaktionsflüssigkeit dient.

3) der graduierten Gasbürette F, die ein Hahn mit Parallelbohrung abschliesst; sie ist während des Versuchs mit Wasser gefüllt. Ein angeschlossenes Glasrohr verbindet sie über den Dreiweghahn c mit dem Desamidierungsgefäss D.

4) der Hempel-Pipette G zur Aufnahme der alkalischen Permanganatlösung. Sie steht durch das Glasrohr g mit der zweiten Bohrung der Gasbürette F in Verbindung.Die Bestimmung des Aminostickstoffes nach van S l y k e lässt sich in drei Phasen zerlegen:

a) Verdrängung der Luft aus der Apparatur mittels reinen Stickoxyds.

b) Zersetzung der Aminosubstanz.

c) Adsorption der Stickoxyde und Messen des reinen Stickstoffes.

Die praktische Ausführung gestaltet sich folgendermassen:

Die durch einen Gummischlauch mit der Gasbürette F in Verbindung stehende, mit Wasser gefüllte Birne H wird gesenkt und so die Permanganatlösung bis in die Bohrung des Hahnes f getrieben. Aus der Gasbürette F drückt man das Wasser in die Kapillare bis zum Hahn c . Nach Schliessen der Hähne b und d stellt man den Dreiwegehahn c so, dass D mit dem Kreuzstück k in Verbindung steht und die Luft auf diesem Wege entweichen kann. Bei geschlossenen Hähnen a und b füllt amn das Gefäss A 8 - 10 ccm Eisessig, lässt ihn nach D zufliessen, gibt darauf in das Gefäß A Natriumnitritlösung bis zur oberen Marke und lässt davon soviel nach D übertreten, dass dieses bis zur Kapillarenverengerung gefüllt ist. Alsdann wird die Verbindung von D mit dem Kreuzstück k durch Schließen des Hahnes c unterbrochen, Hahn a bleibt geöffnet. Durch Schütteln des Gefässes D mit dem Motor wird Stickoxyd entwickelt,das die Flüssigkeit nach A verdrängt; man schüttelt so lange bis das Gas den Raum in D bis zur Marke füllt. Nach Schließen des Hahnes a werden c und f so gestellt, dass zwischen D und F Verbindung besteht. Nunmehr ist die Luft vollständig aus der Apparatur verdrängt und diese für den Versuch selbst vorbereitet.

Hahn a ist geschlossen, es besteht Verbindung zwischen D und F . Aus der Bürette B lässt man 2 ccm der Analysenflüssigkeit zufliessen. Die Birne H ist dabei gesenkt. Das Desamidierungsgefäss wird dann bei der Zersetzung primärer aliphatischer Aminogruppen 5 Min.lang geschüttelt, wobei die Exzenterscheibe 200 - 300 Umdrehungen/Min.machen muss, damit die Reaktion in dieser Zeit qantitativ verläuft. Darnach wird Hahn a geöffnet und das Gas nach F gedrückt.

Hahn f wird um 180° gedreht und das Gas durch Heben der Birne H bis in die obere Kugel der Adsorptionspipette G getrieben. Die Kapillare g muss vollständig mit Wasser gefüllt sein. Darauf wird die Pipette in der gleichen Weise 1 Min. lang kräftig geschüttelt. Durch Senken der

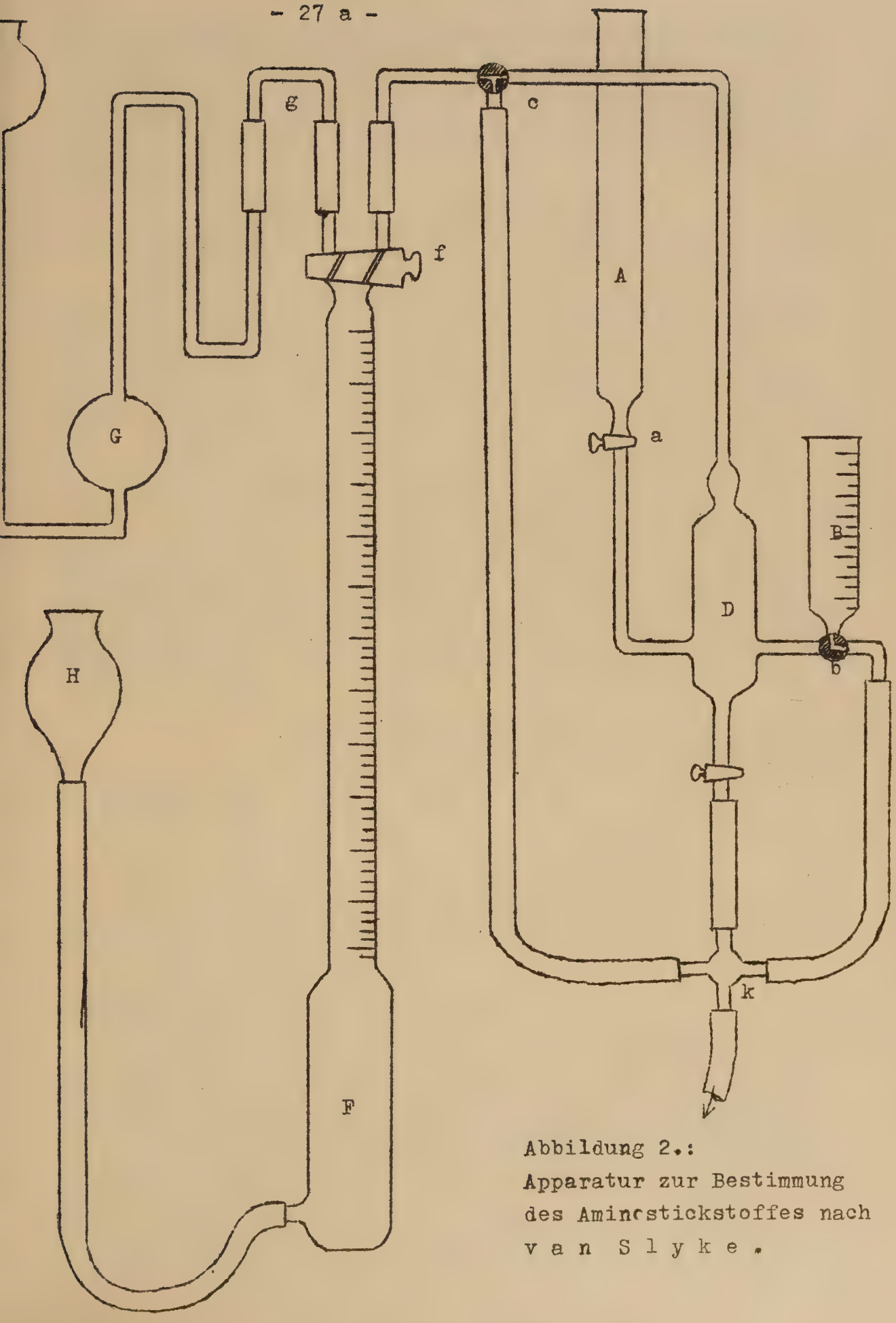

Abbildung 2.:
Apparatur zur Bestimmung des Aminostickstoffes nach v a n S l y k e .

Birne H wird das Restgas langsam nach F gesaugt und bei Niveaugleichheit (Birne und Gasbürette) gemessen. Dieses Verdrängen des Gases nach G und Zurücksaugen nach F wird wiederholt, um ganz sicher zu sein, dass alles Stickoxyd adsorbiert wurde. Für einen neuen Versuch muss die Apparatur stets mit Alkohol und Äther gereinigt und getrocknet werden.

Von Einfluss auf die Bestimmung sind:

1) die Temperatur,
2) der Druck, bei denen das Stickstoffvolumen gemessen wurde.

Wie schon erwähnt, muss vor jedem Hauptversuch der Blindwert der verwendeten Reagentien ermittelt werden. Der Blindversuch wird in genau der gleichen Weise wie der Hauptversuch ausgeführt, nur dass bei der Zersetzung statt der Untersuchungsflüssigkeit die dem Hauptversuch äquivalente Menge Wasser aus der Bürette B zugegeben wird.

Grundsätzlich ist über die Reaktionsfähigkeit der Aminogruppen folgendes zu sagen: Aminogruppen, die sich in α-Stellung zum Carboxyl befinden, werden in 5 Min. bei Zimmertemperatur quantitativ zersetzt. Anders dagegen verhalten sich solche, bei denen das nicht der Fall ist. Die Zersetzung solcher Substanzen, wie es z.B. ein Hexonbasengemisch darstellt, ist erst nach 20-30 Min. vollständig, im übrigen in ziemlichen Maße von der Temperatur abhängig. Bei 1/2-stündigem Schütteln wurden bei der Zersetzung des Hexonbasengemisches im vorliegenden Falle gute Übereinstimmungen erhalten. 2 ccm hydrolysierte Eiweißlösung gaben folgende Daten:

	Temp. °C	Druck mm	abgelesenes Stickstoffvolumen in ccm	
Hauptversuch	19.5	716	6.95	7.0
Blindversuch	19.5	716	0.46	0.50

Mittel: $\frac{6.975 - 0.459}{2}$ = 3.258 ccm N-Gas

Aus den üblichen Tabellen wurde der Wert auf Aminostickstoff umgerechnet; 3.258 ccm N-Gas = 1.7494 mg Aminostickstoff = 0.17494 g in 100 ccm Hydrolysenlösung = 81.99 % Aminostickstoff.

Bestimmung des Ammoniakstickstoffs.

Diese hat insofern eine besondere Bedeutung, als man aus ihrer Menge Schlüsse ziehen kann auf die Mengen von Glutamin, Glutaminsäure sowie Asparagin und Asparaginsäure. Das Ammoniak entstammt in der Hauptsache den Amidgruppen dieser Säuren (1). Vorhandenes Ammoniak beeinflusst aber die in der Folge auszuführenden Bestimmungen sehr ungünstig, es muss deshalb quantitativ durch Destillation entfernt werden.

1) Thierfelder u. v.Cramm, Zs.physiol.Chem. 105, 58 (1919).

Die verbleibenden 80 ccm der Hydrolysenflüssigkeit wurden quantitativ in einen Claissen-Kolben von 750 ccm übergeführt. Dieser wurde mit einem Fraktionskolben von 500 ccm verbunden, der 60 ccm n/10-Schwefelsäure enthielt und als Vorlage diente. An diesen wurde eine zweite Vorlage - ein Fraktionskolben von 250 ccm Inhalt - angeschlossen und mit 20 ccm derselben Säure beschickt. Zu der Hydrolysenlösung wurden alsdann 100 ccm 95-proz. Alkohol und eine Suspension von Calciumhydroxyd in Wasser bis zur alkalischen Reaktion gegeben, der Kolben sofort verschlossen und die Destillation des Ammoniaks bei einem Druck von 12 mm während 30 Min. vorgenommen. Die Temperatur des Wasserbades betrug 38°. Um die Destillationsgeschwindigkeit regulieren zu können, wurde im zweiten Rohr des Claissen-kolbens ein Hahn angebracht. Nach beendeter Destillation wurde das Wasserbad entfernt und das Vakuum durch Oeffnen des Hahnes aufgehoben. Die überschüssige Schwefelsäure wurde mit n/10 Kalilauge zurücktitriert (Methylorange als Indikator).

80 ccm Hydrolysenlösung verbrauchten 12.85 n/10 Kalilauge = 0.01799 g Stickstoff = 0.02248 g in 100 ccm = 10.54 % Ammoniakstickstoff.

Während der Destillation wurden die Huminsubstanzen vom ungelösten Kalk adsorbiert Der gesamte Rückstand wurde von der Lösung abfiltriert, bis zur Chlorfreiheit gewaschen, hierauf samt Filter mit 35 ccm konz. Schwefelsäure zerstört und der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt.

Huminsubstanz I: gefunden 0.00308 g Stickstoff in 80 ccm = 0.003850 g in 100 ccm Urlösung = 1.8 % Huminstickstoff.

Das Filtrat der Huminsubstanzen wurde mit Salzsäure nahezu neutralisiert und i.V. bei 26° und 12 mm Druck (Wasserbad 34°) auf etwa 80 ccm eingeengt.

Fällung der Hexonbasen mit Phosphorwolframsäure.

Der Begriff der „Hexonbasen" wurde von K o s s e l geschaffen. Er versteht darunter Lysin, Arginin und Histidin, die sämtliche je 6 Kohlenstoffatome enthalten und ausgeprägten basischen Charakter besitzen. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie von Phosphorwolframsäure in saurer Lösung gefällt werden. Man kann sie auf diese Weise von den übrigen Aminosäuren abtrennen, die im Filtrat verbleiben. Durch Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlages erhält man das reine Hexonbasengemisch, aus dem die Abtrennung der einzelnen Komponenten vorgenommen werden kann.

Die eingeengte Flüssigkeit wurde unter Nachspülen mit Wasser bis zum Volumen von 100 ccm in einen Erlenmeyer-Kolben von 300 ccm Inhalt übergeführt, mit 18 ccm 35-proz. Salzsäure und einer Lösung von 15 g Phosphorwolframsäure mit 10 ccm Wasser versetzt. (Die Phosphorwolframsäure wurde zuvor nach E. W i n t e r s t e i n (1)

1) Zs.physiol.Chem. 34, 155 (1902).

durch Umkristallisieren gereinigt.) Es fiel in reichlicher Menge ein nahezu weißer Niederschlag aus, der durch Erwärmen auf dem Wasserbad in Lösung gebracht, sich beim Erkalten wieder ausschied. Die Flüssigkeit wurde nun 48 Stunden lang gut verschlossen stehen gelassen. Nach dieser Zeit wurde das Gemisch auf 6° abgekühlt und der Niederschlag auf einer Nutsche von 5 cm Durchmesser von der Flüssigkeit durch mäßiges Saugen abfiltriert. Als Waschflüssigkeit diente eine auf 0° gekühlte 2.5-proz. Phosphorwolframsäurelösung und eine 3.5-proz. Salzsäure, die in Portionen von je 10 ccm zugesetzt wurden. Durch vorsichtiges Rühren auf der Nutsche wurde für gute Vermischung des Niederschlags mit der Waschflüssigkeit gesorgt Das Auswaschen wurde solange fortgesetzt, bis 3 Tropfen des Filtrats in 1 ccm Oxalsäurelösung keine Fällung mehr hervorriefen, d.h. bis das Filtrat calciumfrei war.

Der Hexonbasenniederschlag wurde mittels eines Spatels weitgehend von der Nutsche entfernt und in einem 500 ccm fassenden Scheidetrichter in Wasser suspendiert. Das Filter auf der Nutsche wurde in einer Porzellanschale durch Abspritzen mit Wasser von den anhaftenden Resten des Niederschlags befreit und die Suspension mit der im Scheidetrichter befindlichen vereinigt Das Volumen der wässrigen Suspension betrug insgesamt ca. 250 ccm. Nach Zugabe von 10 ccm 36-proz. Salzsäure wurde mit einem Gemisch aus gleichen Teilen Amylalkohol und Äther ausgeschüttelt. Zur ersten Ausschüttelung wurden 100 ccm dieses Gemischs verwendet und 2 Min. lang geschüttelt. Die Phosphorwolframsäure wird von dem Amylalkohol-Äthergemisch aufgenommen, während die Hexonbasen sich in der salzsauren Lösung befinden. Die Trennung der wässrigen Flüssigkeit von der amylalkoholischen bereitete zunächst einige Schwierigkeiten. Das Gemisch wurde einige Zeit sich selbst überlassen, aber die Trennungsschicht war auch dann keine schärfere. Schließlich blieb kein anderer Weg, als abzunutschen und im Filterrückstand den Stickstoff zu bestimmen. Der an dieser Stelle gefundene Stickstoff rührt von nicht an den ungelösten Kalk adsorbierten Huminsubstanzen her. In 100 ccm Urlösung wurden gefunden: 0.4 mg = 0.23 % Stickstoff.

Die Trennung der beiden Flüssigkeiten war nunmehr möglich geworden. Die wässrige Lösung wurde noch 5-mal mit 50 ccm des Amylalkohol-Äthergemisches ausgeschüttelt. Die vereinigten Gemische wurden zur Entfernung kleiner Mengen Basen 4-mal mit je 10 ccm Wasser behandelt und das Waschwasser nochmals mit Amylalkohol-Äther ausgeschüttelt. Es ist wichtig, dass diese Operationen peinlich durchgeführt werden, weil man eine wässrige Lösung erhalten muss, die absolut frei von Phosphorwolframsäure ist (einige Tropfen der Lösung dürfen in einer gesättigten Bariumhydroxydlösung keinen Niederschlag hervorrufen). Die vereinigten wässrigen Flüssigkeiten, etwa 400 ccm,

wurden im Vakuum bei 12 mm vorsichtig bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen, filtriert und in einem Messkolben von 50 ccm mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Trennung der Hexonbasen.

a) Bestimmung des Gesamt-Stickstoffs.

Sie wurde in 10 ccm der Lösung vorgenommen. Es wurde gefunden: 0.00357 g = 0.01785 g in 50 ccm = 80 ccm Hydrolysenlösung = 0.11159 g in 100 ccm Urlösung.

$$\begin{array}{rl} & 0.11159 \\ + & 0.0004 \quad \text{(Huminstickstoff II)} \\ \hline & 0.11199 \quad = \quad 52.50\ \% \text{ Gesamtstickstoff} \end{array}$$

b) Cystin-Stickstoff.

Die Bestimmung des Cystin-Stickstoffs geschieht indirekt, indem nach W o l f und O e s t e r b e r g (1) der organische Schwefel durch Oxydation in Sulfat übergeführt, als Bariumsulfat gefällt und gewogen wird. Aus der gefundenen Menge Bariumsulfat wird auf Stickstoff umgerechnet. B e n e d i c t (2) und D e n i s (3) arbeiteten für die Oxydation des Schwefels eine Vorschrift aus, nach der - wie folgt - verfahren wird:

10 ccm Basenlösung wurden mit 20 ccm rauchender Salpetersäure in einem Kjeldahl-Kolben von 250 ccm Inhalt vorsichtig erhitzt bis sich keine braunen Dämpfe mehr entwickelten. Der Inhalt des Kolbens wurde alsdann quantitativ in eine Porzellanschale übergeführt und mit 20 ccm Benedict'schem Reagens versetzt; dieses enthält 20 g Kupfernitrat und 5 g Kaliumchlorat in 100 ccm Wasser. Das Reaktionsgemisch wurde vorsichtig auf dem Sandbade erhitzt und allmählich zur Trockne verdampft. Die Schale wurde mit einem Uhrglas gedeckt gehalten, um Verluste durch Herausspritzen zu vermeiden Nach dem Verdampfen der Flüssigkeit wurde die Schale noch 15 Min. auf offener Flamme zur Rotglut erhitzt. Nach dem Erkalten wurde der Rückstand mit 25 ccm Salzsäure (1 + 3) aufgenommen und erwärmt bis sich der ganze schwarze Bodensatz gelöst hatte. Die Salzsäurelösung wurde in ein Becherglas übergeführt, mit Wasser auf etwa 150 ccm verdünnt und 15 Min. im Sieden erhalten. Nach eintägigem Stehen wurde filtriert, das Filtrat auf 200 ccm verdünnt, 5 Tropfen konz. Salzsäure zugegeben und auf dem Wasserbad erhitzt. Zur Fällung des Sulfats wurde unter Umrühren tropfenweise 1-proz. heiße Bariumchloridlösung zugegeben bis keine Fällung mehr entstand. Nach 3-stündigem Erhitzen auf dem Wasserbad und Absetzen des Niederschlags wurde heiß durch einen gewogenen Gooch-Tiegel filtriert und mit Wasser bis zur Chlorfreiheit ausgewaschen. Nach 10-minütigem Glühen wurde gewogen.

1) Biochem.Zs. 29, 429 (1910).
2) Journ. of Biol.Chem. 6, 363 (1909).
3) Journ of Biol.Chem. 8, 401 (1910/11).

Es wurden gefunden: 14.6 mg Bariumsulfat in 10 ccm Basenlösung. 0.0146 x Faktor 0.1373 = 0.002005 g Cystin-S = 0.000875 g Cystin-N = 0.004375 g in 50 ccm Basenlösung = 0.005468 g in 100 ccm Urlösung = 2.56 % Cystin-Stickstoff = 2.49 % Cystin.

c) Arginin.

Die bisherigen Bestimmungen des Argininstickstoffs gründen sich auf die Tatsache, dass das Arginin beim Kochen mit Alkalien die Hälfte seines Stickstoffs in Form von Ammoniak abgibt Im Rückstand der Argininzersetzung wird der Gesamtstickstoff bestimmt. die Summe des hier gefundenen Werts und des bei der Argininzersetzung erhaltenen ergibt den Gesamtstickstoff der Basen. An Stelle dieser indirekten Argininbestimmung wurde in dieser Arbeit eine direkte gewählt und nach der Vorschrift von A. K o s s e l und R.E. G r o ß (1) verfahren. Die Bestimmung beruht auf der Fällung des Arginins mit Flaviansäure (1-α-oxy-2,4-Dinitro-7-naphtolsulfonsäure) und Wägung des Flavianats, das sowohl in Wasser als auch in verdünnten Säuren schwer löslich ist.

10 ccm Hexonbasenlösung wurden mit Wasser im Becherglas auf etwa 100 ccm verdünnt, mit verd. Natronlauge neutralisiert und mit Essigsäure schwach angesäuert. Durch Zusatz von 70 ccm 5-proz. wässriger Flaviansäurelösung wurde das Arginin gefällt und der gelbe flockige Niederschlag 2 Tage im Eisschrank stehen gelassen. Die überstehende Flüssigkeit wurde sodann durch einen gewognen Gooch-Tiegel abgegossen, mit verd. Flaviansäurelösung nachgewaschen und der im Becherglas verbleibende Niederschlag mit 400 ccm 0.5-proz. Flaviansäurelösung auf dem Wasserbad wieder in Lösung gebracht. Die Flüssigkeit wurde wiederum 3 Tage im Eisschrank aufbewahrt. Darnach hatte sich gelbes körnig kristallines Argininflavianat abgeschieden, das auf dem Tiegel abgesaugt, 3-mal mit eisgekühlter Flaviansäurelösung und 1-mal mit Eiswasser nachgewaschen und bei 105° im Trokkenschrank getrocknet wurde.

Rückstand: 0.05595 g = 0.2797 g in 50 ccm = 80 ccm Hydrolysenlösung = 0.3496 g in 100 ccm Urlösung Smp. 261°.

1 Teil Argininflaviat = 0.3566 Teile Arginin
0.3496 g " = 0.1247 g "
= 6.62 % Arginin
Arginin-Stickstoff = 18.79 % (0.04010 g Arg.-N in 100 ccm Urlösung)

d) Aminostickstoff der Hexonbasen.

Die Bestimmung desselben wurde in der vorher beschriebenen Weise in der Apparatur von van S l y k e durchgeführt. Die Einwirkungsdauer der salpetrigen Säure wurde auf 1/2 Stunde ausgedehnt. Es wurde gefunden:

---

1) Zs.physiol.Chem. 135, 169 (1924).

	Temp. °C	Druck mm	abgelesenes Volumen in ccm
Hauptversuch: 2 ccm Basenlösung	19	716	2.50
	19.5	716	2.60
Blindversuch:	19	716	0.86
	19.5	716	0.88

Darnach wurde gemessen: 1.71 ccm Gas bei 19.5°
1.64 ccm Gas bei 19°

Daraus berechnet: 23.03 mg und 22.07 mg in 50 ccm Hexonbasenlsöung = 22.55 mg im Mittel = 0.02255 g in 80 ccm Hydrolysenlösung = 0.028188 g Aminostickstoff in 100 ccm Urlösung = 13.21 %.

e) Bestimmung des Histidins.

Nach der von van S l y k e angegebenen Methode kann der Gehalt an Histidin resp. Histidinstickstoff nur rechnerisch aus dem Nichtamino- und Arginin-Stickstoff ermittelt werden. Da diese rechnerische Feststellung stets mangelhafte Ergebnisse liefern muss, wurde das Histidin als solches direkt bestimmt.

Für eine quantitative Bestimmung von Histidin bestehen theoretisch mehrere Möglichkeiten. Es kann als Carbonat zum Beispiel von Quecksilbersulfat gefällt und gravimetrisch bestimmt werden. Mono- und Diaminosäuren erleiden keine Fällung und es besteht die Möglichkeit, es auf diesem Wege von ihnen abzutrennen. Auch die bei der Bestimmung des Arginins schon erwähnte Flaviansäure eignet sich zur Trennung des Histidins von den anderen Basen. Sie erfolgt auf Grund der verschiedenen Löslichkeit der Flavianate in sehr verdünnter Flaviansäurelösung. Von Argininflavianat sind im Liter z.B. nur 0.017 g löslich, während die Löslichkeit der gleichen Histidinverbindung ungefähr 10-mal so groß ist. Einmal in Lösung gebrachtes Histidinflavianat fällt beim Abkühlen nicht mehr aus, während dies bei Arginin der Fall ist. In neuester Zeit wird auch auf die Salzbildung von Histidin mit Reineckesäure zu Histidin-Reineckat hingewiesen (1) Dieses Doppelsalz besteht aus 1 Mol Histidin und 2 Mol Reinecke-Säure (Reinecke-Säure = Tetrarhodanatodiamin-chromisäure). Das Histidin-Reineckat wird von Pikrolonsäure zerlegt und kann dann als Chlorhydrat mit Salzsäure abgeschieden werden. Diese Bestimmung scheint vorläufig nur für die präparative Praxis in Frage zu kommen, wenn auch die Ausarbeitung eines quantitativen Verfahrens sehr aussichtsreich erscheint, da auf diese Weise die Trennung von Prolin und Oxyprolin sehr gut durchzuführen ist, die meist auf große Schwierigkeiten stößt.

Aus dem Erwähnten geht hervor, dass die quantitative Erfassung des Histidins nicht ganz befriedigend war, bis man eine seiner Farbreaktionen, deren es mehrere gibt,

---

1) J.Kapfhammer u. J.Spörer, Zs.physiol.Chem. 173, 245 (1928).

sich zu Nutze machte. In der Praxis am besten bewährte sich dabei die P a u l y 'sche Diazoreaktion. Sie beruht darauf, dass Histidin mit diazotierter Sulfanilsäure einen roten Farbstoff liefert. Diese Reaktion erfuhr in der Folge eine Modifikation von E. G e b a u e r - F ü l l n e g g (1), wobei statt Sulfanilsäure p-Nitranilin verwendet wird Imidazolderivate bilden mit diazotiertem p-Nitranilin Farbstoffe, die sich leicht und vollständig mit Butylalkohol sodaalkalischer Lösung ausschütteln und im Kolorimeter bestimmen lassen. Wie in neuester Zeit geziegt wurde, ruft Zugabe von Pyridin eine Farbvertiefung im Butylalkohol hervor.

Arbeitsweise (2): 1 ccm 1/2-proz. p-Nitranilinlösung wurden mit 1 ccm 1/2-proz. Natriumnitritlösung versetzt, unter Eiskühlung 1/2 ccm Salzsäure (1:1) zugegeben und solange geschüttelt bis die Flüssigkeit entfärbt war. Zu dieser diazotierten Lösung wurde 1 ccm des Hexonbasengemisches gegeben und nochmals kurz in Eis gekühlt. Dann wurde mit 20-proz. Sodalösung bis zur vollständigen Ausfällung des Farbstoffs alkalisiert und das Reaktionsgemisch im Scheidetrichter 3-mal mit einem Gemisch aus 9 Teilen Butylalkohol und 1 Teil Pyridin ausgeschüttelt, wodurch der rote Farbstoff vollständig in das organische Lösungsmittel überging. Die kolorimetrische Messung wurde im L a n g e 'schen Absolutkolorimeter vorgenommen. In dieser Apparatur wird die Lichtabsorption auf elektrischem Wege gemessen, die Messung ist eine absolut objektive, weil unabhängig vom Auge, daher auch eine sehr genaue. Die ausgeschüttete rote Farbstofflösung wurde in einer 100 ccm fassenden Küvette mit Butylalkohol-Pyridingemisch bis zur Marke aufgefüllt und gemessen. Zur Null-Stellung wurde eine ebenfalls 100 ccm fassende Küvette mit reinem Lösungsmittelgemisch verwendet. Die Bestimmung des Histidins in der geschilderten Weise war möglich geworden durch die schon erwähnten Untersuchungen in der hiesigen Forschungsanstalt für Untersuchung der Lebensmittel. Es wurden dort Eichkurven für reines Histidin und Histamin aufgestellt, wobei auf der Abszisse mg Histidin resp. Histamin gegen die Adsorption in Prozenten auf der Ordinate aufgetragen wurden. Bei der Bestimmung des Histidins im Rohkaffee wurde im Kolorimeter eine Absorption von 61.5 % für 1 ccm Lösung gemessen = 0.41 mg Histidin (3). In 50 ccm Hexonbasenlösung = 20.50 mg = 80 ccm Hydrolysenlösung = 0.02562 g Histidin in 100 ccm Urlösung = 1.36 %.

Histidin-Stickstoff: 0.00693 g in 100 ccm Urlösung = 3.25 %.

---

1) Zs.physiol.Chem. 191, 222 (1930).
2) B.Bleyer und Mitarbeiter, Biochem.Zs. 286, 410 (1936).
3) Der Wert ist der neuesten, noch nicht veröffentlichten Eichkurve für Histidin, die von B. B l e y e r und Mitarbeitern aufgestellt wurde, entnommen. Sie weicht etwa von der früheren ab.

f) Lysin-Stickstoff.

Er kann nach der Analyse von van S l y k e nur rechnerisch ermittelt werden.

Lysin-Stickstoff = Gesamt-N - (Arg.-N + Histidin-N + Cystin-N) = 0.11159 - (0.04010 + 0.00693 + 0.00547) = 0.05909 g in 100 ccm Hydrolysenlösung = 27.70 %.

Über die Verteilung des Stickstoffes auf die einzelnen Bestandteile des Hexonbasen-Niederschlages unterrichtet die nachstehende Tabelle 9.

Tabelle 9.

Cystin-N %	Arginin-N %	Histidin-N %	Lysin-N %
2.56	18.79	3.25	27.70

Filtrat vom Hexonbasenniederschlag.

Es enthält sämtliche nicht mit Phosphorwolframsäure fällbaren Aminosäuren und zerfällt in einen Teil, der mit salpetriger Säure reagierenden Stickstoff enthält = Aminostickstoff; der Nichtaminostickstoff gehört Prolin, Oxyprolin und evtl. vorhandenem Tryptophan an, soweit letzteres durch die Hydrolyse nicht vollständig zerstört wurde.

Das gelb gefärbte Filtrat wurde mit den verschiedenen Waschflüssigkeiten vereinigt und mit Natronlauge versetzt bis eben eine Trübung eintrat. Dann wurde Essigsäure zugegeben bis die Lösung wieder vollkommen klar war. Die etwa 700 ccm darstellende Flüssigkeit wurde i.V. bis zur beginnenden Kristallisation der Salze eingeengt, in einen Messkolben von 100 ccm übergespült und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. 20 ccm dieser Lösung wurden mit 35 ccm Schwefelsäure zerstört und darin der Gesamt-Stickstoff bestimmt.

20 ccm verbrauchten 7.42 ccm Lauge = 0.01038 g Stickstoff = 0.05190 g in 100 ccm = 80 ccm Hydrolysenlösung = 0.06487 g in 100 ccm Urlösung = 30.40 %.

Aminostickstoff im Filtrat der Basen.

Zur Bestimmung des Aminostickstoffs wurden wie schon bei den früheren Versuchen 2 ccm der Lösung verwendet. Die Einwirkungsdauer der salpetrigen Säure wurde auf 6 Min. ausgedehnt.

	Temp. °C	Druck mm	abgelesenes Volumen ccm	
Hauptversuch	19	716	2.16	2.14
Blindversuch	19	716	0.48	0.50
Aminostickstoff			1.68	1.64

Mittel: 1.66 : 2 = 0.83 ccm = 0.5384 mg Amino-N = 0.04468 g in 100 ccm = 80 ccm Hydrolysenlösung = 0.05510 g in 100 ccm Urlösung = 25.80 %.

Gesamt-N	0.06487 g
Amino-N	0.05510 g
Nichtamino-N	0.00977 g = 4.5 %

Über die durch die im Vorhergehenden beschriebenen Versuche ermittelte Verteilung des Stickstoffs im wasserlöslichen Protein des Rohkaffees unterrichtet die nachstehende Tabelle 10.

Tabelle 10.

Die Stickstoffverteilung im wasserlöslichen Protein des Rohkaffees.

Stickstoff	mg in 100 ccm Hydrolysenlösung	%
Ammoniak	22.48	10.54
Humin	3.85	1.80
Cystin	5.47	2.56
Arginin	40.10	18.79
Histidin	6.93	3.25
Lysin	59.09	27.70
Amino im Filtrat der Basen	55.10	25.8
Nichtamino " " "	9.77	4.50
	202.79	94.94
Durch direkte Analyse gef.	213.36	
zu wenig ...	10.57 mg	

Bestimmung von Tyrosin und Tryptophan.

Nach der Methode von van S l y k e besteht keine Möglichkeit diese beiden Aminosäuren auch nur indirekt durch die Ermittlung des Stickstoffgehalts quantitativ zu erfassen. Tyrosin wird ebenso wie Tryptophan von Phosphorwolframsäure nicht gefällt. Auch im Filtrat der Basen können diese Säuren nicht mehr gefunden werden. Der als Nichtaminostickstoff bezeichnete Anteil setzt sich aus eventuell vorhandenem Prolin, Oxyprolin und Tryptophan zusammen.

Nach dem ältesten Verfahren wurde Tyrosin gravimetrisch bestimmt. Nach der Säurehydrolyse ließ man es in neutraler Lösung zusammen mit Cystin auskristallisieren. Da Cystin in pflanzlichem Material fast stets nur in geringen Mengen vorhanden ist, wurde diese Substanz direkt als Tyrosin gewogen. Es liegt auf der Hand, dass man die auf diese Weise erhaltenen Werte für Tyrosin anzweifeln muss, da es unwahrscheinlich ist, dass diese Kristallisation quantitativ verläuft und ausserdem die Säurehydrolyse weitgehende Veränderungen im Molekül hervorruft. In der Folge machte man sich dann die schon erwähnte Diazoreaktion zunutze. Tyrosin liefert ebenso wie Histidin mit diazotierter Sulfanilsäure Farbstoffe,

die kolorimetrisch erfasst werden können. Zur Trennung dieser beiden kann aus dem Gemisch das Histidin mit Phosphorwolframsäure entfernt werden, während Tyrosin in Lösung bleibt. Zu dieser Bestimmungsweise ist zu sagen, dass sie - wie E. H a n k e und F. K o e s l e r (1) zeigten - für reine Aminosäuregemische sehr wohl brauchbar ist. Sie versagt aber, wenn es sich darum handelt, in einem Protein das Tyrosin zu bestimmen (2), weil die Farbreaktion in nicht unerheblichem Maße von Alanin, Glykokoll usw. gestört wird. J. W a r k a n y (3) verdankt man die genaue Untersuchung des Brom-Additionsvermögens von Tyrosin, das auch zur quantitativen Bestimmung ausgewertet worden war. Der Genannte stellte fest, dass durch die Säurehydrolyse brombindende Substanzen von unbekannter Natur gebildet werden, sodass auf diese Weise stets zu hohe Tyrosinwerte erhalten werden. O. F o l i n und A.D. M a r e n z i (4) beschäftigten sich mit der Rotfärbung, die man erhält, wenn man eine tyrosinhaltige Lösung mit Millon'schem Reagenz versetzt. Aber auch diese dem Tyrosin allein zugeschriebene Reaktion ist keineswegs eindeutig und liefert Fehlresultate.

Nicht weniger schwierig gestaltete sich die Bestimmung von Tryptophan; während vieler Jahre war man bemüht auf diesem Gebiet etwas Brauchbares, vor allen Dingen auch für die Praxis der angewandten Chemie zu schaffen. Von Bedeutung waren die kolorimetrischen Untersuchungen von O. F ü r t h und E. N o b e l (5), die alle bisher angegebenen Verfahren einer Prüfung unterzogen. Da sie feststellten, dass diese mehr oder weniger brauchbar waren gingen sie daran neue zu schaffen und zogen bei ihren Untersuchungen die Eiweißreaktion nach E. V o i s e n e t (6) heran; sie beruht darauf, dass Eiweiß mit nitrithaltiger Salzsäure und etwas Formaldehyd versetzt eine violettblaue Färbung liefert. Für diese Reaktion glaubten sie das Tryptophan verantwortlich machen zu können. Einige Jahre später wurde aber festgestellt (7), dass die auf diese Weise erhaltenen Tryptophanwerte zumindest angezweifelt, wenn nicht als falsch bezeichnet werden mussten, da die Loslösung dieser Aminosäure aus dem Molekullarverbande (durch Hydrolyse) so weitgehende Veränderungen hervorruft, dass die Intensität der Violettfärbung sehr bald abklingt gegenüber einer Standardlösung von reinem Tryptophan. Sehr zu begrüßen waren deshalb die Mitteilungen von J. T i l l m a n s und A. A l t (8) über ein neues Verfahren. Dieses wurde 1 Jahr später von E. K o m m (9) überprüft und seine Anwendung für die

---

1) Journ. of Biol.Chem. 50, 237 (1922).
2) O.Fürth, Biochem.Zs. 146, 259 (1924).
3) Biochem.Zs. 146, 265 (1924).
4) Journ.Biol.Chem. 83, 89 (1929).
5) Biochem.Zs. 109, 103 (1920).
6) Chem.Zbl. 1906, I, 90
7) O.Fürth u.Z.Dische, Biochem.Zs. 146, 275 (1924).
8) Biochem.Zs. 164, 135 (1925).
9) Zs.physiol.Chem. 156, 202 (1926).

Praxis empfohlen. Dieses Verfahren hat gegenüber allen anderen, früher gebrauchten den großen Vorzug, dass vorherige Hydrolyse des Proteins nicht nötig ist. Sie beruht darauf, dass tryptophanhaltige Substanzen mit Formollösung und Schwefelsäure eine Gelbfärbung geben, die sich gegenüber einer in gleicher Weise behandelten reinen Tryptophanlösung kolorimetrieren lässt. Ausserordentlich begrüsst konnte es aber werden, als es J. T i l l m a n s, P. H i r s c h und F. S t o p p e l (1) gelang, ein Verfahren zu schaffen, das die gleichzeitige Bestimmung von Tyrosin und Tryptophan im Eiweißverbande nebeneinander gestattet. Die Grundlage dieses neuen Verfahrens bildet die Xanthoproteinreaktion, d.h. die Auswertung jener Gelbfärbung, die auftritt, wenn Eiweiß mit Salpetersäure behandelt wird. Es war F. L i e b e n (2) gelungen die vom Eiweiß beim Behandeln mit Salpetersäure aufgenommenen Nitrogruppen zu bestimmen und festzustellen, dass hierfür allein Tyrosin und Tryptophan in Frage kommen. Diese Tatsache allein bot schon die Möglichkeit wenigstens diese beiden Aminosäuren mit Sicherheit erfassen zu können, ohne dabei - wie bei allen früheren Verfahren - fürchten zu müssen, dass Sekundärreaktionen stören könnten. In der Folgezeit studierte H. M ö r n e r (3) die Farbeffekte diese Nitrokörper in saurer und alkalischer Lösung. Zum Vergleich zog er n/50 Kaliumbichromatlösungen heran. Das Ergebnis seiner Untersuchungen war, dass die Färbungen in saurer und alkalischer Lösung sich stark unterscheiden. Diese Nitrokörper verhalten sich also ähnlich wie Indikatoren. Die Farbwirkung derselben wird in saurer Lösung intensiver als in alkalischer oder umgekehrt sein. Die Übergänge finden innerhalb eines bestimmten p_H-Bereiches statt. Analog dem Dissoziationsgrad kamen J. T i l l m a n s und Mitarbeiter zu dem Begriff „Farbgrad", worunter sie das Verhältnis des gefärbten Anteils zur Gesamtmenge färbender Substanz verstanden. Der Farbgrad sagt selbstverständlich nichts aus über die Intensität der Farbe. Diese kann vielmehr erst erfasst werden, wenn sie mit einer Lösung verglichen wird, deren Menge an färbenden Bestandteilen bekannt ist (Standardlösung). Deshalb braucht man einen kolorimetrischen Einheitswert, der als „Farbstärke" S bezeichnet wird. Die Farbstärke ist die Zahl, die angibt, wie oft mal so stark eine bestimmte Farblösung gefärbt ist als die Standardlösung. Diejenige Farbstärke aber, die von der Mengeneinheit eines bestimmten Indikators (Tyrosin und Tryptophan) geliefert wird, nennt T i l l m a n s den Farbwert f. Er bestimmte nun diese Farbwerte für Tyrosin und Tryptophan aus einem reinen Gemisch dieser beiden Aminosäuren für p_H-Stufen von 1.8 bis 12.9, indem

---

1) Biochem.Zs. 198, 379 (1928).
2) Biochem.Zs. 145, 535 (1924)
3) Zs physiol.Chem. 4/5, 203 (1919)

er sie gegen eine alkalische m-Nitrophenollösung (50 mg auf 500 ccm n/10-Natronlauge) kolorimetrierte. Die Größe und die Abhängigkeit des Farbwertes ist aus der nachfolgenden, der Arbeit von J. T i l l m a n s (1) entnommenen Tabelle zu ersehen.

Tabelle 11.

p_H	f Tyrosin	f Trypto-phan	p_H	f Tyrosin	f Trypto-phan
1.8	0.10	0.40	7.0	2.5	0.85
2.1	0.20	0.41	8.4	4.2	0.95
2.5	0.35	0.43	9.5	6.2	1.10
3.2	0.50	0.50	10.0	6.5	1.20
4.0	0.63	0.60	11.5	7.0	1.23
5.0	0.88	0.64	12.9	7.4	1.30
6.0	1.5	0.70			

Unter Benutzung dieser Farbwert-Tabelle ist nunmehr die Bestimmung von Tyrosin und Tryptophan möglich. Bei einer Reihe von Untersuchungen wiesen T i l l m a n s und Mitarbeiter nach, dass die besten Resultate erhalten werden, wenn die Bestimmungen bei zwei möglichst weit auseinanderliegenden p_H-Stufen ausgeführt werden.

Arbeitsweise:

1) Standardlösungen: 50 mg reines m-Nitrophenol (Smp.96°) wurden in 500 ccm n/10 Natronlauge gelöst und in einer braunen Flasche aufbewahrt.

2) 0.5 g Eiweiß wurden in einem Rundkolben mit Glasschliff mit 400 ccm n/10 Salpetersäure versetzt und 2 Stdn. auf dem kochenden Wasserbad am Rückflusskühler erhitzt. Nach dem Erkalten wurde mit Natronlauge genau neutralisiert, in einen Messkolben von 500 ccm übergespült und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung war klar und gelb gefärbt.

   Es wurde auf folgende p_H-Stufen eingestellt.

a) 70 ccm Albuminlösung + 25 ccm n/10-Salzsäure + 5 ccm Wasser; p_H = 1.8.

b) 70 ccm Albuminlösung + 20 ccm n/10-Salzsäure + 10 ccm Wasser; p_H = 1.9.

c) 50 ccm Albuminlösung + 8.5 ccm n/10-Natronlauge + Wasser bis zum Volumen von 100 ccm; p_H = 11.9.

d) 50 ccm Albuminlösung + 5.3 n/10-Natronlauge + Wasser bis zum Volumen von 100 ccm; p_H = 11.7.

e) 60 ccm Albuminlösung + 3.3 ccm n/10-Natronlauge + Wasser bis zum Volumen von 100 ccm; p_H = 11.4.

---

1) Biochem.Zs. 198, 379 (1928).

Der kolorimetrische Vergleich wurde im Dubosq-Apparat vorgenommen. Unter Anwendung des Beer'schen Gesetzes wurden zuerst die Farbstärken S ermittelt. Für die folgenden zwei p_H-Stufen sei die Berechnung von S erläutert.

$$C_1 = \frac{D_2}{D_1} C_2 \; ; \qquad C_1 = S\,1$$

D_2 = Schichtdicke der Standardlösung; D_1 = Schichtdicke der Albuminlösung; C_2 = Konz. der Standardlösung (50 mg auf 500 ccm); C_1 = gesuchte Konz. = Farbstärke.

I. $p_H = 1.8$; $D_2 = 3.9$

$D_1 = 50 \times 7/10 = 35$ (70 ccm Albuminlösung waren auf 100 ccm verdünnt)

$C_1 = \frac{3.9}{35} \cdot 50 = 5.57 = S_1$ = mg Tyrosin + Tryptophan in 500 ccm Albuminlösung.

$S_1 = 5.57$

$p_H = 11.9$; $D_2 = 13.5$

$D_1 = 5/10 \times 11 = 5.5$ (50 ccm Albuminlösund waren auf 100 ccm verdünnt)

$C_1 = \frac{13.5}{5.5} \cdot 50 = 122.8 = S_2$ mg Tyrosin + Tryptophan in 500 ccm Albuminlösung.

$S_2 = 122.8$

Der Tabelle 11 wurde nun die den p_H-Stufen entsprechenden Farbwerte für Tyrosin und Tryptophan entnommen. Es ergeben sich folgende Bestimmungsgleichungen:

x = Tyrosin; y = Tryptophan

$p_H = 1.8$ $\quad 0.10\,x + 0.40\,y = 5.57\ (S_1)$

$p_H = 11.9$ $\quad 7.1\,x + 1.25\,y = 122.8\ (S_2)$

x = 15.53 mg Tyrosin
y = 7.55 mg Tryptophan } in 500 ccm Albuminlösung

Bei einer Einwaage von 533.6 mg = 500.14 mg Trockensubstanz:
Tyrpsin = 3.09 %
Tryptophan = 1.51 %

In genau der gleichen Weise wurden die Farbstärken noch für zwei saure und zwei alkalische p_H-Stufen ermittelt.

II. $p_H = 1.9$ $\quad \frac{4.3}{35} \cdot 50 = 6.13 = S_1$

$p_H = 11.7$ $\quad \frac{15.2}{5.5} \cdot 50 = 138.0 = S_2$

$0.13\,x + 0.40\,y = 6.13$
$7.0\,x + 1.24\,y = 138$

x = 18.05 mg Tyrosin y = 9.46 mg Tryptophan
Tyrosin 3.61 %; Tryptophan 1.89 %

III. $p_H = 1.9 \quad \frac{4.3}{35} \cdot 50 = 6.13 = S_1$

$p_H = 11.4 \quad \frac{15.9}{6.6} \cdot 50 = 120.0 = S_2$

$$0.13\,x + 0.40\,y = 6.13$$
$$6.9\,x + 1.23\,y = 120.0$$

x = 15.58 mg Tyrosin y = 10.25 mg Tryptophan

Tyrosin	3.12 %
Tryptophan	2.05 %

Unter Ausschaltung des ausser der Reihe fallenden Wertes von 3.61 % Tyrosin ergibt sich der mittlere Gehalt an

Tyrosin	3.11 %
Tryptophan	1.78 %

Im wasserlöslichen Eiweiß des Rohkaffees konnten also folgende Aminosäuren gefunden und bestimmt werden:

Arginin	6.62 %
Histidin	1.36 %
Tyrosin	3.11 %
Tryptophan	1.78 %
Cystin	2.49 %

Zusammenfassung.

1) Die Bestimmung des Gehaltes an Chlorogensäure im Kaffee erwies sich nach den im Schrifttum angeführten Verfahren als unmöglich; sie muss erneut in Angriff genommen werden.

2) Das Vorhandensein von reduzierendem Zucker im Kaffee in einer Menge von 1.16 % (berechnet als Glukose) konnte eindeutig nachgewiesen werden.

3) Das Vorhandensein von Saccharose im Kaffee in einer Menge von 6.43 % konnte eindeutig nachgewiesen werden.

4) Zur Isolierung der Saccharose aus pflanzlichem Material auf dem Wege über das Octacetylderivat wird ein Verfahren angegeben, das sich sowohl beim Rohkaffee wie auch bei Grünmalz bewährt hat.

5) Das Eiweiß des Kaffee-Samen besteht zum größten Teil aus Albumin, doch sind daneben auch Globuline, Prolamine und Gluteline vorhanden.

6) Die Untersuchung des Albumins ergab, dass dasselbe in der Verteilung des Stickstoffs nicht völlig demjenigen anderer Pflanzenarten entspricht. Der Stickstoff der Hexonbasen beträgt etwa die Hälfte des Gesamtstickstoffs.

7) Im Albumin konnte die Anwesenheit von Histidin, Arginin, Cystin, Tryptophan und Tyrosin nachgewiesen und der Anteil dieser Aminosäuren an der Zusammensetzung desselben ermittelt werden.

Lebenslauf.

Am 14. August 1908 wurde ich als Tochter des Oberforstrats Karl Kopp und dessen Ehefrau Lina, geb. Reichert zu Ottenhöfen in Baden geboren. Nach 3 ½-jährigem Besuch der Volksschule in Schopfheim in Baden trat ich dort in die Oberrealschule ein und erhielt im März 1927 das Zeugnis der Reife. Meiner Lehrzeit als Apothekerpraktikantin genügte ich von 1928 bis 1930 in der Stadtapotheke zu Schopfheim. Nach einjähriger Assistentenzeit in Kiel und Eltville a.Rhein bezog ich im Sommersemester 1931 die Universität Freiburg. Im Sommersemester 1932 setzte ich mein Studium an der Universität München fort und bestand im April 1933 die Pharmazeutische Staatsprüfung. Nach einsemestrigem Studium in Halle a.d.Saale bestand ich im Dezember 1934 das zweite chemische Verbandsexamen an der Universität München. Im Januar 1935 begann ich mit der Ausführung vorliegender Arbeit.